

Laterális feloldás és képminőség javítása vonalpásztázó tomográfiás optikai mikroszkópban

Doktori értekezés

Dudás László

Témavezetők:

Prof. Dr. Szabó Gábor

Dr. Erdélyi Miklós

Fizika Doktori Iskola

Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem,

Természettudományi és Informatikai Kar

2013

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke:	3
1. Bevezetés.....	3
2. Tudományos háttér.....	6
2.1. Optikai mikroszkópia	6
2.1.1. Mikroszkópiai módszerek áttekintése.....	6
2.1.2. Laterális feloldás.....	9
2.1.4. Konfokális mikroszkópia elméleti áttekintése	11
2.2. Számítógépes tomográfia	14
2.2.1. Szinogram rögzítése.....	14
2.2.2. Rekonstrukciós eljárások	15
2.2.3. Forgatási hibák a számítógépes tomográfiában	18
2.2.4. Számítógépes tomográfia alkalmazása optikai tartományban	19
2.3. Vonalpásztázó tomográfiás mikroszkóp.....	19
2.4. Anizotrópia	22
3. Célkitűzések	25
4. Anyag és módszer	25
4.1 Feloldás meghatározása, képminőség vizsgálata.....	26
4.2 Mérésvezérlés, adatgyűjtés és kiértékelés	29
5. Új Tudományos eredmények	31
5.1. Forgatási hiba vizsgálata LSTOM rendszerben.....	31
5.1.1. Tomográfiás adatgyűjtés LSTOM rendszerben	31
5.1.2. Szimulációk.....	35
5.1.3. Kísérleti elrendezés és mérések	40
5.1.4. Konklúziók.....	46
5.2 LSTOM asztigmia segítségével előállított pásztázó vonallal.....	47
5.2.1. Optikai tengely eltéréseinek korrigálása	47
5.2.2. Asztigmias vonal létrehozásának elméleti áttekintése	50
5.2.3. Asztigmias LSTOM kísérleti megvalósítása	52
5.2.4. Konklúziók.....	55
5.3 LSTOM adaptálása biológiai alkalmazásokhoz	55
5.3.1. Konfokális, fluoreszcens LSTOM építése	56
5.3.2. Mérési eredmények.....	60
5.4 LSTOM fázismanipuláció	62
5.4.1. Fázismanipuláció megvalósítása fokális régióban.....	62
5.4.2. Fázismanipuláció megvalósítása távoli zónában	68
5.4.3. Fázismanipulációt megvalósító LSTOM mikroszkóp	72
6. Konklúzió	76
7. Summary	79
Köszönetnyilvánítás	79
Irodalomjegyzék.....	82

Rövidítések jegyzéke:

AFM	-	Atomic force microscope
AU	-	Airy unit
CCD	-	Charged coupled device
CMOS	-	Complementary metal oxide semiconductor
CT	-	Computertomography
ELWD	-	Extra long working distance
Epi	-	Episcopic
FBP	-	Filtered Back-Projection
FWHM	-	Full Width at Half Maximum
HILO	-	Highly inclined and laminated optical sheet
LED	-	Light-emitting diode
LSF	-	Line Spread Function
LSTOM	-	Line-scanning tomographic optical microscope
MTF	-	Modulation Transfer Function
NA	-	Numerical Aperture
OCT	-	Optical coherence tomography
OPD	-	Optical path difference
OPT	-	Optical Projection Tomography
OSLO	-	Optical Software for Layout and Optimization
PALM	-	Photo-Activated Localization Microscopy
PET	-	Positron emission tomography
PMT	-	Photomultiplier tube
PO	-	Pontszerű objektum
PSF	-	Point Spread Function
RCs	-	Richardson csillag
SIM	-	Structured illumination microscope
SLM	-	Spatial Light Modulator
SPECT	-	Single Photon Emission Tomography
SPIM	-	Selective plane illumination microscope
STED	-	Stimulated Emission Depletion
STM	-	Scanning Tunneling Microscope
STORM	-	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TDM	-	Tomographic diffractive microscopy
TIRF	-	Total Internal Reflection Fluorescence
VAE	-	Vectorial aperture engineering

1. Bevezetés

Doktori értekezésem tárgya egy vonallal pásztázó tomográfiás mikroszkóp elméleti és kísérleti vizsgálata. A végső cél a mikroszkóp laterális feloldásának növelése, amelyet a kivilágítás manipulálásával fogunk elérni. A dolgozatban elsőként egy vázlatos képet alkotok a mikroszkópiáról, mint igen szerteágazó tudományterületről. Áttekintem, hogy melyek egy mikroszkóp fontosabb paraméterei, és sorra veszem a fontosabb, laterális feloldást célzó megoldásokat. Részletesebben kitérek a laterális feloldás definíciójára és a konfokális detektálásra. Ezután áttekintem a számítógépes tomográfia egyik adatgyűjtési módszerét, és a kiértékeléshez szükséges algoritmusokat. A 2.3 fejezetben bemutatom a vonallal pásztázó tomográfiás optikai mikroszkóp működési elvét, amely a tomográfia révén szünteti meg a hagyományos vonalpásztázás átviteli függvényében tapasztalható anizotrópiát. A tomográfiás adatgyűjtés megvalósítása során felmerülő kísérleti nehézségekkel foglalkozok az 5.1 fejezetben. Megmutatom, hogy a pásztázó vonal forgatásához használt prizmák pozicionálásában vétett pontatlanság és az alkalmazott forgatók hibája, az adatgyűjtés hibájához vezetnek. Ezért részletesen vizsgálom a hibák forrását és modellt alkotok azok leírására. A végzett számolások alapján kitűzésre kerül egy hibahatár, amely garantálja a képek megfelelő minőségét. Megvizsgálom, hogy ez a hibahatár mit jelent a mikroszkóp rendszerre nézve, azaz milyen feltételeket szab az alkalmazott eszközökre és azok beállítási pontosságára. Mérésekkel fogom megvizsgálni, hogy egyes kísérleti elrendezések milyen mértékben tesznek eleget a kritériumnak. Mint ahogy a vizsgálatból kiderül, korrekciók szükségesek a megfelelő képminőség biztosításához, ezért az 5.2 fejezetben áttekintem a lehetséges megoldások, úgymint szoftveres korrekciók, kalibráció, markerek, valós idejű korrekció alkalmazhatóságát. Megvizsgálom egy alternatív kivilágítást, amely hibamentesen forgatható. Asztigmiás vonal hozható ugyanis létre kettőtörő lemezzel, amelyhez kapcsolódó elméletet 2.4 fejezetben tekintem át, majd az 5.2 fejezetben vizsgálom a kísérleti megvalósíthatóságát. Az asztigmiás mikroszkóp elsősorban reflexiós mérésekre alkalmas, én ellenben a valós biológiai minták vizsgálata irányába teszek lépéseket. Ennek érdekében áttekintem az 5.3 fejezetben, hogy hogyan valósítható meg a tomográfiás mikroszkópban konfokális detektálás, amellyel vastag biológiai mintákról készült felvételek tehetők kontrasztosabbá. Emellett optimalizálom a rendszert fluoreszcenciás mérésekhez. Az 5.4 fejezetben térek rá a kivilágítás eloszlásának manipulációjára, amit kétféle módon hajtok végre. Az egyik egy interferencián alapuló módszer, amely emiatt egy kevésbé

stabil módszer, de alkalmas a feloldásjavulás demonstrálására. A másik módszernél a kivilágító nyaláb fázisviszonyait módosítom. Egy vonalpásztázó elrendezés segítségével közel 40% feloldásjavulást demonstrálok, majd diszkutálom, hogy mit kell szem előtt tartani, ha a módszert tomográfiás mikroszkópban akarjuk alkalmazni. Végül egy fázismanipulációt alkalmazó tomográfiás mikroszkóp kísérleti megvalósítását és az elért eredményeket mutatom be.

2. Tudományos háttér

2.1. Optikai mikroszkópia

Egy optikai mikroszkóp feladata, hogy többnyire látható fény segítségével képet szolgáltatson egy olyan objektumról, amelynek részleteit az emberi szem, mint leképező rendszer nem képes feloldani. A mikroszkóp által létrehozott kép ideális esetben a tárgy méreteivel arányos és torzulásmentes, lehet virtuális vagy valós. Előbbi esetben a mikroszkóp a szemmel együtt alkot egy leképező rendszert, azaz a képsík a retina, utóbbi esetben a valós kép rögzítésre kerülhet például egy fényérzékeny chipen. A leképező rendszerünk feloldását (R), azaz azt, hogy segítségével milyen kis objektumokat tudunk egymástól megkülönböztetni, korlátozza a fény hullámtermészete ($R \approx 200\text{nm}$). Emiatt igen fontos szerepet foglal el a vizsgálati módszerek körében az elektronmikroszkópia [1] és az atomszondás pásztázó módszerek (STM, AFM [2]), amelyek ugyan jobb (0,1-30nm) laterális feloldással rendelkeznek, de bizonyos területeken, mint a biológiában csak limitáltan alkalmazhatóak. Ezért játszanak továbbra is fontos szerepet a különböző optikai mikroszkópok a biológiai vizsgálatokban.

2.1.1. Mikroszkópiai módszerek áttekintése

Mára az optikai mikroszkópok igen sok változata fejlődött ki. A különböző megoldások eltérő paraméterek javítását célozzák, időnként bizonyos tulajdonságok rovására. A legfontosabb a mikroszkóp nagyítása, laterális és axiális feloldása, ezek befolyásolják egy kép részletességét, élességét. Emellett fontos a kapott kép zajszintje, kontrasztja, az elkészítéséhez szükséges idő. Szempontokat képeznek a mikroszkóp használhatóságával, alkalmazhatóságával kapcsolatos tényezők például, hogy a minta lehet-e tetszőlegesen vastag, élő, mennyire legyen áttetsző, szükségszerű-e a megfestése, igényel-e esetleg speciális festéket; szükséges-e speciálisan elkészített optikai elem a rendszerbe (speciális objektív, fáziselem), biztosítani kell-e különleges feltételeket, például a mechanikai, hőmérsékleti stabilitás tekintetében, illetve, hogy eme feltételek teljesítése mellett mennyire marad egyszerű, kezelhető, megfizethető a rendszer. Sok esetben ezért nem beszélhetünk abszolút értelemben vett jobb vagy rosszabb mikroszkópról, hanem van a feladatra alkalmasabb, egy adott részletet, tulajdonságot jobban feltáró, vagy épp könnyebben használható mikroszkóp. Ezért a dolgozat tárgyát képezi számos fontos gyakorlati kérdés is. Ennek fényében tekintsük át az 1. táblázat alapján a mikroszkópia fontosabb evolúciós trendjeit.

A legegyszerűbb mikroszkóp egy objektívől és egy okulárból áll, kiegészítve megfelelő kivilágítással (Köhler [3], Epi [4]), és egy detektorral (szem, CCD). Mivel a biológiai minták sok esetben áttetszőek, ezért hagyományos transzmissziós módban kapott kép gyakran alacsony kontrasztú. Ezért jelentős előrelépést jelentett a sötét látómezős mikroszkóp [3], és különösen a fáziskontraszt mikroszkóp [3,5] felfedezése. A mikroszkópok biológiai alkalmazhatóságát tovább javította a fluoreszcens jelölés módszerének finomodása [6]. Egy hagyományos reflexiós mikroszkópban a megfelelő színi szűrők és érzékeny detektorok alkalmazásával vizsgálhatóvá válnak fluoreszcens minták. A biológiai struktúrák egyes részei sok esetben specifikusan festhetőek. Ekkor különösen kontrasztos képeket kaphatunk. Ha a minta azonban kevésbé szelektíven festhető, vagy a megfestett részleteket sűrűn tartalmazza, akkor problémát jelenthet egy vastagabb minta esetén, hogy kivilágításkor a tárgysíkon kívüli tartományokat is gerjesztjük. Ezen régiókból érkező, nem kívánatos fény csökkenteni fogja a rögzített kép kontrasztját.

	Leképezés (Widefield Microscopy)	Pásztázás (Scanning Microscopy)	
Általános kivilágítás	Köhler, Epi	Pont	Vonal
Speciális kivilágítás	Sötét látómezős, TIRF, SPIM, SIM	4Pi, Theta, Apertúrafüggvény tervezés, Radiális polarizáció, Többfotonos mikroszkópia, STED	SIM
Általános detektálás	Emberi szem CCD*, CMOS kamera	Intenzitás felösszegzése (Félvezető detektorok, PMT, ...)	Vonal CCD, CCD
Speciális detektálás	STORM, PALM	Konfokális, 4Pi, Theta	Konfokális, Theta

1. Táblázat: fontosabb optikai mikroszkópiai módszerek áttekintése

Eltérő megközelítést alkalmaznak a pásztázó mikroszkópok, amelyek egy meghatározott struktúrát (pont, vonal) fókuszálnak a mintába, és mozgatva a struktúrát pásztázzák azt. A reflektált vagy fluoreszcencia révén emittált fotonokat a megfelelő detektorok rögzítik. Ezen mikroszkópok egyik előnye, hogy konfokális detektálással [7-9] kiegészítve a fókuszsíkon kívülről származó (gerjesztés vagy szórás révén keletkező) fényt kiszűrik. Egy ponttal pásztázó mikroszkóp esetén a konfokális detektálás úgy valósítható meg, hogy a fókuszsík konjugált síkjába, a detektor elé egy tűlyukat helyezünk el, amely kiszűri a megvilágított fókuszponton kívülről érkező fluoreszcens fényt. A fókuszsík előtti vagy mögötti régióból induló fénysugarak

ugyanis egy életlen képet hoznak létre a tülyuk síkjában, azaz egy kiterjedtebb foltot, amelynek csak kis részét engedi át a tülyuk (részletesebben a 2.1.4 fejezetben). A detektáláshoz fotoelektron-sokszorozó (PMT) alkalmazható, amely érzékenysége révén előnyt jelenthet fluoreszcens alkalmazásokban. A jobb kontraszt, érzékenység és a vastag mintában megvalósuló szelektivitás (optikai szelektív tulajdonság) ára, hogy pontról pontra le kell pásztázni a mintát, ami időigényes lehet. A pásztázás gyorsasága rezonáns tükrökkel, forgó prizmákkal vagy akusztó-optikai eltérítőkkel gyorsítható [4,9]. Gyorsabb pásztázás valósítható meg, ha egy vonal mentén világítjuk ki a mintát és egy irányban pásztázunk rajta végig [9-11]. Ekkor a kivilágított tartományt egy vonaldetektorra képezzük le pontról pontra. Ha a detektorsor kellőképpen keskeny, akkor vonalpásztázás esetén is érvényesül a konfokálitás hatása. A pásztázás tovább gyorsítható, ha több pontot képezünk egyszerre a mintába. Megfelelő tülyuk- és lencserendszer segítségével konfokálitás valósítható meg (Nipkow-lemez [9]). A konfokális rendszerek további előnye a mélységi szelektivitás mellett, hogy javítják a laterális és axiális feloldást.

A ponttal történő pásztázás, további potenciálokkal bír: a kivilágító fókuszfolt alakja kedvezően alakítható, továbbá a kis térfogatba történő fókuszálás révén lehetőség nyílik többfotonos gerjesztésre [12]. A fókuszfolt manipulációja több módon megvalósítható. Két objektív egymással szemben [13], vagy bizonyos szög alatt [14,15] elhelyezhető és a létrejövő fókuszfoltok interferáltathatóak, amely révén jelentős axiális feloldásjavulást érnek el. E módszerek nehézsége az interferometrikus pontosság megvalósításában rejlik, továbbá a speciális geometriák a mintapreparálásnál jelentenek megszorításokat. Az objektív előtt, a kivilágító nyaláb manipulálásával is befolyásolható a fókuszfolt alakja, mérete. Az objektív közepét annuláris [16-18] apertúrával kitakarva például növelhető a laterális feloldás, amely egyben egy elnyújtottabb fókuszfoltot eredményez axiális irányban. Ehhez hasonlóan a kivilágító nyaláb fázisa is módosítható, mint például a bevonatos objektívek [19-21], vagy a konfokális mikroszkópiában alkalmazott speciális apertúrák esetén [22,23]. A kivilágító nyaláb polarizációs viszonyainak befolyásolása is módosíthatja kedvezően a képalkotást. Radiálisan poláros nyaláb használatával [24,25], vagy eltérő polarizációjú kivilágítással készült képek kombinálásával (VAE mikroszkóp [26]) növelhető például a laterális feloldás.

A teljes látómezős módszerek esetén is elérhető mélységi szelektivitás. SPIM esetén [27,28] egy hengerlencse által létrehozott diffrakciólimitált „fény-lappal” világítják ki a megfigyelési irányra merőlegesen a mintát, így érve el, hogy a fókuszon kívül ne történjen

gerjesztés. Hasonló kivilágítást eredményez a HILO [29]. TIRF kivilágítás [9] esetén az evanescens hullámok közeghatártól távolodva gyorsan lecsengenek ($\approx 100\text{nm}$), ezért a mintának csak egy vékony metszete kerül kivilágítása, de ebben az esetben nem készíthető felvétel a minta több síkjáról az előzőekkel ellentétben. Strukturált kivilágítás esetén (SIM [30-32]) a mintát egy szinuszos ráccsal világítják ki és képezik le egy CCD-re. A mintáról, a rácsot forgatva, irányonként legalább három fázis alkalmazása mellett készítenek felvételeket, majd a képekből rekonstruálják a tényleges képet, amely kétszeres feloldás-növekedést mutat a hagyományos kivilágítással rögzített képhez képest. Ha egy mikroszkóp feloldása adott hullámhossz és adott objektív esetén a Rayleigh-féle feloldási küszöböt legalább kétszeresen haladja meg, akkor szuperfeloldásról szokás beszélni [33]. Ez valósul meg a SIM mellett például a lokalizációs mikroszkópiában (PALM [34], STORM [35]), ahol elérik azt, hogy egyedülálló pontszerű emitterek világítsanak egy-egy képalkotási ciklusban, ekkor ugyanis ezek pozíciója (az emitterek képének illesztésével) a diffrakció limit alatti pontossággal meghatározható. További megoldás a STED mikroszkóp [36], amelyben egy diffrakciólimitált pontban gerjesztik a festékmolekulákat, majd ezt követően egy gyűrű formájú kioltó nyalábot alkalmaznak, amely a gyűrű közepét leszámítva (ahol az elektromos térerősség nulla) visszajuttatja a molekulákat alapállapotba kényszerített emisszió révén. A gerjesztett állapotban maradt fluorofórok emisszióját mérik meg ezután.

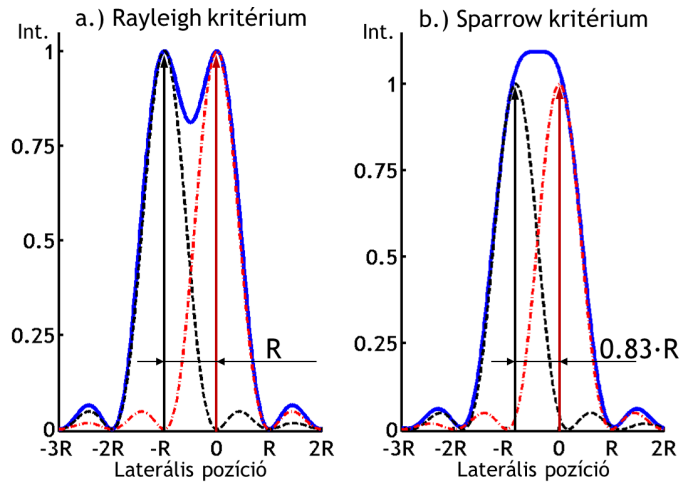
A bemutatott technikák kombinálhatóak számos módon. A későbbi vizsgálatok szempontjából fontos, hogy vonalpásztázó mikroszkóp esetén megvalósítottak konfokális detektálást, θ detektálást, továbbá manipulálták a vonal-kivilágítást a hossza mentén strukturált kivilágítással, javítva a laterális feloldást [37-43]. Én a vonallal pásztázó tomográfiás optikai mikroszkóp laterális feloldására fogok új módszert javasolni, amelyet az 5.4 fejezetben részletezek. A fluoreszcens és konfokális vonalpásztázó rendszer tomográfiás rendszerbe történő átültetését az 5.3 fejezetben mutatom be.

2.1.2. Laterális feloldás

Tekintsünk egy leképező rendszert, amely a vizsgált tárgyról méretarányos, leképezési hibáktól mentes képet ad. A diffrakció miatt egy pontszerű objektum képe egy kiterjedt folt, egy Airy korong [4]. Emiatt, ha túl közel helyezünk el egymáshoz két pontszerű inkoherens forrást a tárgysíkból, akkor azok képe összemosódik a képsíkban, azaz a rendszer képtelen megkülönböztetni, feloldani a két objektumot. A leképező rendszer *laterális feloldása* az a

távolság, amely távolságra helyezve a két tárgyponthoz azok a képen még éppen megkülönböztethetők.

A megkülönböztethetőség definiálására szokás két kritériumot használni. A két pontforrás a Rayleigh kritérium értelmében elkülönül, ha a képsíkban az egyik Airy folt maximuma a másik Airy folt első minimumára esik (1.a). Ha a két pontforrást ezen túl közelítjük, akkor



1. ábra: Laterális feloldás kritériumai két sinc² eloszlás esetén

azok egyre inkább összeolvadnak, azaz a két Airy folt csúcsa közötti nyereg mélysége egyre csökken. Amikor a nyereg megszűnik, akkor válik a két tárgyponthoz a Sparrow kritérium értelmében feloldatlanná (1.b) [44, 45]. A pontforrás képe, azaz a leképező rendszer Dirac függvényre adott válasza, pontátviteli függvénye a PSF (Point Spread Function), amely információt hordoz a rendszer felbontóképességéről, és nem utolsósorban az aberrációkról is (aszimmetria, mellékmaximumok magassága). Inkoherens leképezésnél a PSF és a tárgy intenzitáseloszlásának konvolúciója adja meg a kép intenzitáseloszlását. [44]

A ponttal pásztázó mikroszkópban a feloldás hasonlóan határozható meg [9]. Kollimáljunk egy pontszerű fényforrásból kiinduló nyalábot (ideális esetben gömbhullámot), majd fókuszáljuk le a mintára. A fókusz síkban létrejövő intenzitáseloszlás (PSF) ideális esetben egy Airy folt, amelynek főmaximuma és első minimuma közötti távolság (R_{Airy}) a diffrakcióelmélet értelmében: $R_{Airy} = k_A \cdot \frac{\lambda}{NA}$, ahol λ a fény hullámhossza, NA a fókuszáló lencse (objektív) numerikus apertúrája és $k_A=0,61$ konstans. A fentiekhez hasonló értelmezésben: két pontszerű objektum a pásztázó mikroszkóp által akkor feloldható a Rayleigh kritérium értelmében, ha távolságuk R_{Airy} .

Pásztázás esetén is a rögzített kép intenzitáseloszlását a tárgy és a pontátviteli függvény (PSF) konvolúciója adja meg. A PSF-fel történő konvolúció ekvivalens frekvenciatérben a PSF Fourier-transzformáltjával, a frekvencia-átviteli függvénnyel (MTF) történő szorzással. Mivel a PSF a diffrakció miatt véges kiterjedésű, ezért az MTF-fel való szorzás egy szűrésnek felel meg, amelyek a minta Fourier-transzformáltjának nagyfrekvenciás komponenseit elnyomja, és a

határfrekvencia felettieket teljesen kiszűri, ezáltal elmosva a képen a kis részleteket. Az MTF levágási frekvenciája alapján a Rayleigh-féle feloldási küszöb jól meghatározható [9,44].

Vonallal történő pásztázás esetén hasonlóan határozható meg a feloldás. A fókusz síkban létrejövő diffrakciólimitált vonal intenzitáseloszlását, a PSF analógiájára vonalátviteli függvénynek (LSF – line spread function) hívják. Diffrakciólimitált aberrációmentes esetben a fókuszált vonal keresztmetszeti eloszlása egy $\text{sinc}^2 = \left(\frac{\sin x}{x}\right)^2$ függvénnyel írható le, melynek maximuma és első minimuma közötti távolság $R = k \cdot \frac{\lambda}{NA}$, ahol k konstans értéke 0,5. Általában feltehető, hogy sinc^2 függvények maximális értéke a vonal hossza mentén állandó.

Vonallal pásztázó mikroszkóp esetén a képalkotás úgy történik, hogy a mintát a vonalra merőleges irányban (Y) végigpásztázzák, és az egyes pozíciókban a kivilágított régiót leképezik egy vonaldetektorra. Az LSF megadja a pásztázó vonal intenzitáseloszlását, míg a PSF egy pontszerű forrás vonalpásztázással rögzített képe. A PSF vonalpásztázás esetén anizotrópiát mutat, ugyanis a pásztázás irányában a feloldást az LSF eloszlása határozza meg, ezért

$R_y = 0,5 \cdot \frac{\lambda}{NA}$, míg a vonal hossza mentén a feloldást a pontonkénti leképezés határozza meg,

ezért $R_x = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$ [46,47]. Az eltérés dominánsabbá válik, ha a feloldásjavító módszert

alkalmazunk, például a vonal hossza mentén (SIM, [38,39]), vagy a vonalra merőleges irányban (konfokálitás, fázismanipuláció 5.4 fejezet). Ezen esetekben fontos az anizotrópia megszüntetése. Ez megvalósítható úgy, hogy több irányból készítünk felvételt a mintáról és a kapott képeket egyesítjük [10,38,39].

2.1.4. Konfokális mikroszkópia elméleti áttekintése

A konfokális detektálás a ponttal pásztázó mikroszkóp analógiájára oly módon valósítható meg vonalpásztázó rendszerben, hogy a rendszert kivilágító rés konjugált síkjába elhelyezünk egy vonaldetektort [9]. Ezzel ekvivalens megoldás, ha egy CCD-t helyezünk el a konjugált síkban, és egy vagy több pixelsorát használjuk rés helyett [10]. Tekintsük át, hogyan valósul meg a szelektivitás a rés által. Tegyük fel, hogy a pásztázó vonal az objektív fókusz síkjában kivilágít egy infinitezimálisan keskeny, reflektáló vonalat. A reflektív vonal által visszavert fényt az objektív kollimálja és a konfokális síkban egy lencse lefókuszálja a résre. A reflektáló vonalat minél inkább kimozdítjuk a tárgysíkból, akkor a képe a konfokális síkban annál elmosódottabb,

kiterjedtebb lesz, és ezáltal egyre kevesebb fény jut át a résen, azaz ha a tárgysíkon kívülről érkezik fény, azt a rés által szelektáljuk. A konfokális rés zárásával csökken a résen átjutó fény, amivel bizonyos fokig csökkenthető ezen kiválasztott régió vastagsága, de lesz egy diffrakció által limitált vastagsága. A konfokális karban detektált intenzitás, azaz a vonallal pásztázó konfokális rendszer eredő vonalátviteli függvénye (LSF_{er}) megadható az alábbi formulával [2,9,48]:

$$LSF_{er}(x, y, z) = LSF_{kiv}(x, y, z) \cdot (LSF_{det}(x, y, z) \otimes D(x, y)) \quad (2.1)$$

A formulában LSF_{ill} a kivilágítás és LSF_{det} a detektálás átviteli függvényei. D a detektor apertúra függvénye Airy egységben. Az Airy egység definiálásához helyezzük újra a fókuszba az infinitezimálisan keskeny vonalat. Annak diffrakciólimitált képe a konfokális síkban egy vonal, amelynek intenzitásprofilja a hosszára merőleges irányban egy sinc^2 függvénnyel írható le. Az alkalmazott rés 1AU szélességű, ha a rés két pereme éppen az első minimumokra esik. Ha a rést zárjuk, D apertúra függvény egyre jobban megközelíti a Dirac függvényt, azaz határesetben a vele történő konvolúció magát LSF_{det} -et adja vissza. Ha a rés széles, akkor $LSF_{det} \otimes D$ egy kiszélesedett eloszlást eredményez, amely révén a kivilágítás (LSF_{kiv}) egyre nagyobb része eléri a detektort. Teljesen nyitott rés esetén $LSF_{er} = LSF_{kiv}$. Maga az $LSF_{det} \otimes D$ lényegében a mintára leképezett rés, amely „kijelöl” egy tartományt, ahonnan a LSF_{kiv} -ből származó fotonokat gyűjtjük. LSF_{er} az alábbi módon számolható skalár diffrakció [48] alapján:

$$LSF_{er}(y, z) = \left| \int_{-\alpha}^{\alpha} P_{kiv}(\theta) \cdot \exp(-ik y \sin \theta) \cdot \exp(-ik z \cos \theta) k \cos \theta d\theta \right|^2 \quad (2.2)$$

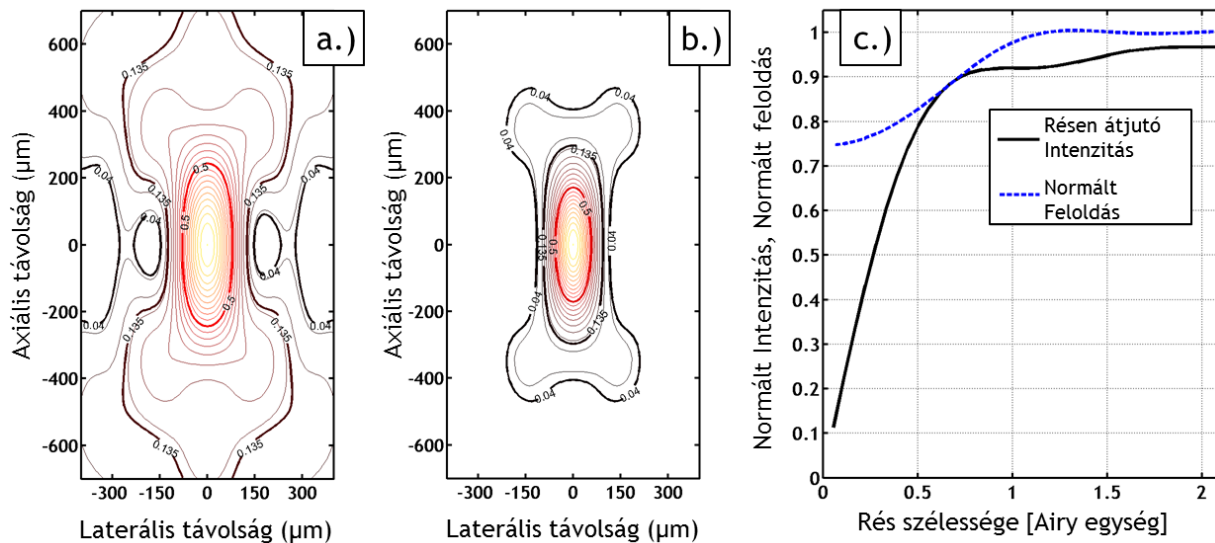
$$\int_{-s}^s \left| \int_{-\alpha}^{\alpha} P_{det}(\theta) \cdot \exp(-ik(y - y_s) \sin \theta) \cdot \exp(-ik z \cos \theta) k \cos \theta d\theta \right|^2 dy_s$$

ahol $P_{kiv}(\theta)$ és $P_{det}(\theta)$ a kivilágítás és detektálás apertúra függvényei (apodizációs tagok) polárkoordinátákban megadva, k a hullámvektor hossza, α az objektív apertúrájának félszöge ($\alpha = \arcsin(NA/n)$) és s a rés szélességének a fele Airy egységekben értve. Homogén síkhullám kivilágítást, és reflexiós módot feltételezve az apertúra függvények:

$$P_{kiv}(\theta) = P_{det}(\theta) = \begin{cases} 1 & , \text{ha } -\alpha \leq \theta \leq \alpha \\ 0 & , \text{egyébként} \end{cases} \quad (2.3)$$

Ezen elmélet alapján számolt, a maximum értékkel normált LSF-ek láthatóak az 2.a és b ábrákon azonos skálával ábrázolva és kiemelve a következő szintvonalakat: első mellékmaximum magassága ($\approx 4\%$), e^{-2} (0,135%), és a csúcsok félértéke (50%).

2.a ábra mutatja a hagyományos vonalpásztáz mikroszkóp LSF-jét, ami LSF_{kiv} -nak felel meg (mivel $s \rightarrow \infty$), míg a b. ábrán a konfokális LSTOM eredő LSF-je látható végtelenül keskeny rés ($s \rightarrow 0$) esetén. Látható, hogy a konfokális detektálás alkalmazásával a fókuszsíktól (axiálisan) távol eső részekből lényegesen kevesebb fény éri el a detektort, hiszen az LSF e^{-2} szintvonala mélységelességi távolságban fogja körül az LSF-et, míg hagyományos esetben szinte a mélységelesség háromszorosáig elnyúlik. Axiális és laterális feloldásjavulást egyaránt tapasztalunk, ha a félértékszélességet összehasonlítjuk a két esetben. A c. ábrán látható folytonos görbe mutatja a detektorra jutó intenzitást a rés szélességének függvényében [9]. A görbét a



2. ábra: számolt LSF (a) hagyományos és (b) konfokális módban.
(c) laterális feloldás és a detektált intenzitás változása a rés szélességének függvényében.

teljesen nyitott rés esetén számolt összintenzitással normáltam. 1 Airy egység széles rés esetén a fény jelentős része (90%-a) átjut a résen. A szaggatott görbe mutatja a konfokális LSF alapján számolt laterális feloldást a rés szélességének függvényében. A grafikonon a hagyományos LSTOM feloldásával ($k=0,5$) normált értékeket tüntettem fel. Látható tehát, hogy a rés zárásával a laterális feloldás javítható, de ezt gyakorlatban nem feltétlenül használható ki, hiszen ez a detektorra jutó fluoreszcens fény intenzitását jelentősen csökkenti. A grafikont tekintve például 0,5 Airy egység széles rés esetén a fény 20%-át kell feláldoznunk 18% feloldásjavulás érdekében.

Fluoreszcens mérések esetén a rést a magasabb fotonhozam érdekében 1 Airy egység szélesre választottam.

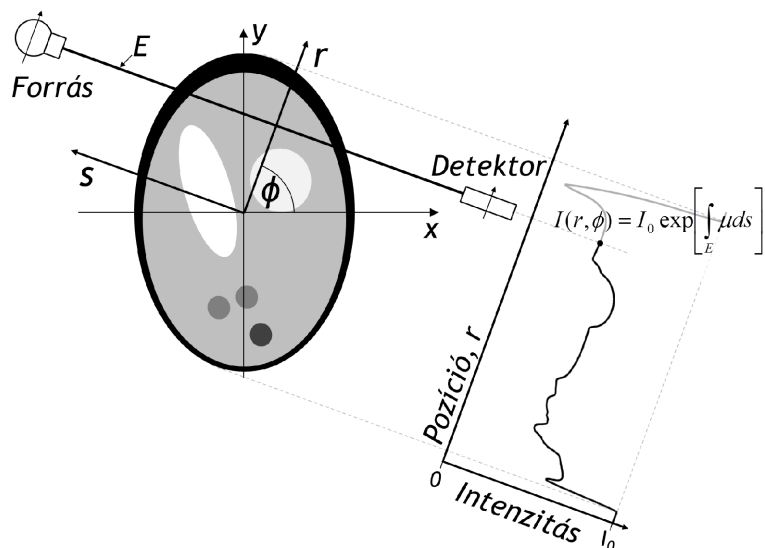
Ezt a modellt fogom a későbbiekben használni módosított formában a fázismanipulációs módszerek leírásánál is.

2.2. Számítógépes tomográfia

A tomográfiai módszereket főként az orvosi diagnosztikában és preklinikai vizsgálatokban is használják arra, hogy nem invazív módon jussanak információhoz a vizsgált emberi vagy állati szervezet belső struktúrájáról, funkciójáról. Az információt hordozhatják a szervezetbe jutatott emitterek által kibocsátott fotonok (PET, SPECT [49]), vagy a testen áthaladó röntgensugarak elnyelődésének mértéke (CT [50]). A tomográfias adatgyűjtés során több irányból gyűjtünk információt és számítógépes algoritmusok segítségével rekonstruáljuk ezen információból az elnyelés alapján a szervezet belső felépítését, vagy jutunk funkcionális információhoz az alapján, hogy hol halmozódtak fel a bevitt emitterek. A következőkben a számítógépes röntgen tomográfiát (CT) fogom részletesebben áttekinteni [51, 52].

2.2.1. Szinogram rögzítése

Tekintsük az 3. ábrán látható röntgen tomográfias adatgyűjtési geometriát. A vizsgált objektumot egy kollimált röntgensugár-nyalábbal világítjuk át, és az objektum áttellenes oldalán egy röntgendetektort helyezünk el. Egy adott síkban együtt mozgatjuk a forrást és a detektort r irányban úgy, hogy a röntgennyaláb (E) iránya (s)



3. ábra: tomografikus adatgyűjtés folyamata

merőleges a pásztázás irányára. Adott pozíciókban rögzítjük az objektumon átjutó sugárzás intenzitását (I), amely azon régiók elnyelésétől (μ) függ, amelyeken a nyaláb áthalad. Az E egyenessel reprezentált nyaláb iránya (s) tehát merőleges r tengelyre. A cél, hogy a pásztázást

több irányból megismételve meghatározzuk az objektum egyes régióinak elnyelését. Az adott síkban jelölje az abszorpciós koefficiensek (μ) térbeli eloszlását $f(x,y)$ skalárfüggvény. A mintát átvilágító nyaláb helyzetét jellemezzük az origóból a nyalábhoz húzott normálisának hosszával (r), és annak x tengellyel bezárt szögével. Ekkor az E egyenes egyenlete (Hesse-féle normálalakban):

$$x \cdot \cos \phi + y \cdot \sin \phi - r = 0 \quad (2.4)$$

A nyaláb intenzitás a közegen áthaladva a Beer-Lambert törvény szerint fog csökkenni:

$$I(r, \phi) = I_0 \exp \left[\int_E f(x, y) ds \right] \quad (2.5)$$

Amennyiben a forrás I_0 intenzitását állandónak tekinthetjük, akkor a detektált intenzitás természetes logaritmusa az $f(x,y)$ függvény (r, ϕ) nyaláb mentén vett integráljával arányos:

$$p(r, \phi) = \int_E f(x, y) ds \quad (2.6)$$

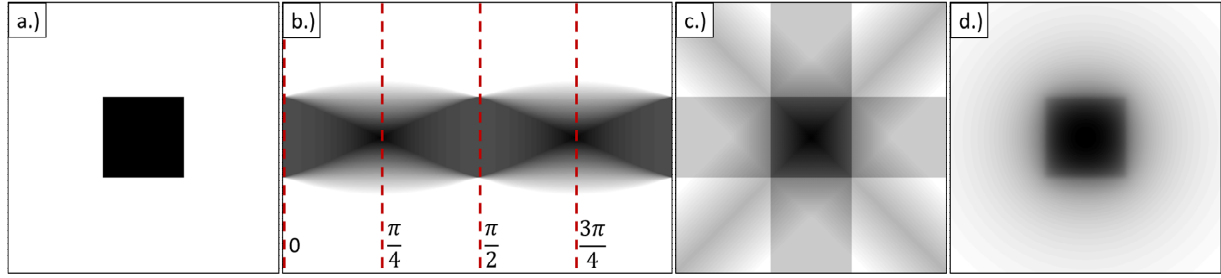
A p értékét adott r, ϕ értékekre szokás sugárösszegnek nevezni. A gyakorlatban a sugárösszeg bizonyos r_i ($i=1..M$), pontokban kerül rögzítésre, esetünkben konstans $\Delta r = r_i - r_{i-1}$ távolságokra egymástól, az origó körül szimmetrikusan ($r_k=0$, $M=2k+1$). Ezt az M adatból álló halmazt nevezzük a későbbiekben ϕ irányú projekciónak. A több ϕ_j ($j=1..N$) irányban rögzített projekciók alkotta $N \times M$ adattömböt szinogramnak nevezik. A projekciókat konstans $\Delta \phi = \phi_i - \phi_{i-1}$ szögelfordulások mellett fogjuk a későbbiekben rögzíteni.

2.2.2. Rekonstrukciós eljárások

A rekonstrukció célja, hogy a szinogramból meghatározzuk $f(x,y)$ függvényt. Az egyik legegyszerűbb megoldás a visszavetítéses módszer, amelynél egy adott pixelhez tartozó értéket úgy határozzunk meg, hogy a szinogramból kiválasztjuk és összeadjuk azon sugárösszegeket, amelyek a pixelen áthaladó sugarakhoz tartoznak. Azaz:

$$f(x, y) = \sum_{j=1}^N p(x \cos \phi_j + y \sin \phi_j, \phi_j) \Delta \phi \quad (2.7)$$

Tekintsük példaként az alábbi 4.a ábrán látható négyzet szinogramját (4.b). Ha kiválasztjuk a szinogramból a $[0, \pi/4, \pi/2, 3\pi/4]$ irányú projekciókat, és visszavetítjük azokat, akkor kapjuk a 4.c ábrát. A háttér homogénné válik, ha megfelelő számú projekciót vetítünk vissza, de látható 4.d képen, hogy a négyzet kontúrjai elmosódnak, a kép homályossá válik. Ez a rekonstrukciós algoritmus egyszerű és gyors, de a rekonstruált kép minősége nem megfelelő.

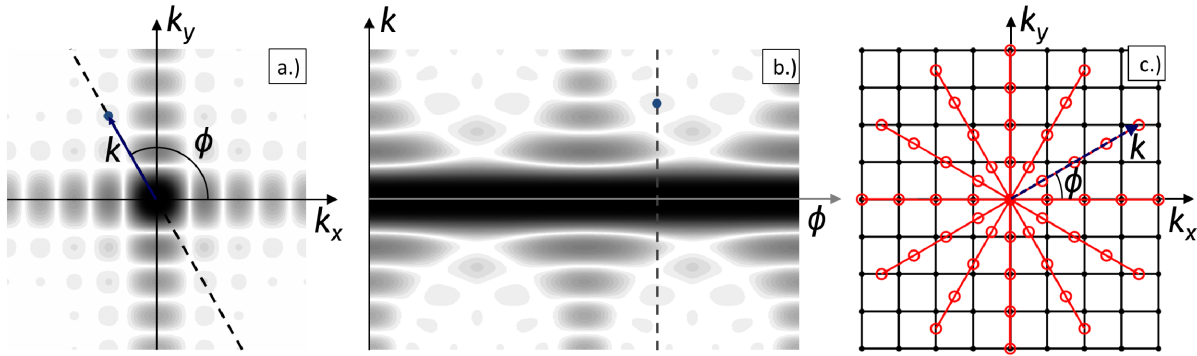


4. ábra: négyzet alakú (a) objektum képe és (b) annak szinogramja.
(c) 4 illetve (d) 360 darab projekció visszavetítésével készült rekonstruált képek

Vizsgáljuk a rekonstrukciót Fourier térben. Megmutatható, hogy az egyes projekciók Fourier transzformáltja megadja az $f(x,y)$ tárgyfüggvény $F(k_x,k_y)$ Fourier transzformáltjának értékeit az egyes projekciók iránya mentén.

Szemléltetésképpen tekintsük a következő ábrát, ahol 5.a ábra mutatja egy négyzet 2 dimenziós Fourier-transzformáltját és 5.b ábrázolja egy négyzet szinogramjának projekciónkénti Fourier transzformáltját. A két ábrát összevetve különösen $\phi=0,\pi$ (azaz k_x,k_y) irányok mentén sejthető a Fourier komponensek egyenlősége. Igazoljuk az alábbiakban az állítást.

Ehhez finomítsuk elsőként a projekció fenti definícióját. Reprezentálja a keresett $f(x,y)$ függvényt



5. ábra: négyzet alakú (a) objektum és (b) szinogramjának Fourier transzformáltja.
(c) Mintavételezés tomográfias felvétel esetén.

az $f'(r,s)$ függvény az elforgatott r,s koordináta-rendszerben, ahol a koordináták között fennáll, hogy:

$$r = x \cdot \cos \phi + y \cdot \sin \phi, s = -x \cdot \sin \phi + y \cdot \cos \phi \quad (2.8a,b)$$

Ekkor a ϕ irányhoz tartozó projekciót az f' függvény s tengely menti integrálja adja meg, azaz:

$$p(r, \phi) = \int_{-\infty}^{\infty} f'(r, s) ds \quad (2.9)$$

Tekintsük ekkor a p projekció Fourier transzformáltját, majd helyettesítsük be p -t:

$$P(k, \phi) = \int_{-\infty}^{\infty} p(r, \phi) \exp(-2\pi i k r) dr = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f'(r, s) \exp(-2\pi i k r) ds dr \quad (2.10)$$

Térjünk át ezek után az x, y koordinátarendszerre, figyelembe véve, hogy $k_x = k \cos \phi$ és $k_y = k \sin \phi$ továbbá, hogy $ds dr = dx dy$, mivel a Jacobi determináns értéke 1, ezért:

$$P(k, \phi) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp[-2\pi i (k_x x + k_y y)] dx dy \quad (2.11)$$

A jobb oldali kifejezés megegyezik $f(x, y)$ Fourier-transzformáltjával, tehát:

$$P(k, \phi) = F(k_x, k_y) \quad (2.12)$$

Gyakorlatban P és F diszkrét, és a megfelelő F értékeket interpolációval lehetséges meghatározni. Az 5.c ábra szemlélteti a mintavételezést Fourier térben a két függvény esetén. A későbbiekben, ha p -t Δr lépésközzel rögzítettük, akkor az egy Δr pixelméretű rekonstruált képet fog eredményezni, azaz Δk_x és Δk_y egyenlők Δk értékével. Az F értékek pontos interpolációja körülményes, és számolásigényes lehet, továbbá pontatlanságot okozhat nagyobb k_x, k_y értékekre, azaz degradálhatja a rekonstruált kép finomabb részleteit.

A Fourier térben történő interpolációnál praktikusabb és pontosabb (elmosódottságtól mentes rekonstruált képet eredményező) formula vezethető le, amely a korábban ismertetett visszavetítést alkalmazza. Tekintsük F inverz Fourier-transzformációját:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(k_x, k_y) \exp[2\pi i (k_x x + k_y y)] dk_x dk_y \quad (2.13)$$

Térjünk át polár-koordinátákra a frekvenciatérben, a $k_x = k \cos \phi$, és $k_y = k \sin \phi$ helyettesítéssel. Figyelembe véve, hogy ekkor a Jacobi determináns értéke k , azaz $dk_x dk_y = k dk d\phi$, és felhasználva 2.12 egyenlőséget, a kapott kifejezés:

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} P(k, \phi) \exp[2\pi i r] k dk d\phi \quad (2.14)$$

Vegyük figyelembe, hogy a ϕ és a $\phi + \pi$ irányok mentén rögzített projekciók megegyeznek, azzal a különbséggel, hogy az ellentétes irányban kerülnek rögzítésre, azaz $p(r, \phi + \pi) = p(-r, \phi)$. Ezt felhasználva áttérhetünk 0 és π határok közötti integrálásra. Emellett kiírva a p Fourier-transzformációját a következőt kapjuk:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p(r, \phi) \exp(-2\pi i k r) dr \right\} k \exp(2\pi i k r) dk d\phi \quad (2.15)$$

Ez azt jelenti tehát, hogy a projekciót Fourier transzformáljuk, majd $|k|$ -val történő szorzást követően a szorzat inverz Fourier-transzformáltját vesszük. Ezt műveletet szokás szűrésnek nevezni, hiszen ezzel a magas frekvenciás komponenseket felerősítjük. Szokás emellett más típusú függvényekkel szűrést végezni. A külső integrál a korábban ismertetett visszavetítéssel azonosítható. A módszert Szűrt-Visszavetítéses módszernek (FBP – Filtered Backprojection) hívják. Ezt az algoritmust fogom a későbbiekben használni a rekonstrukcióhoz.

2.2.3. Forgatási hibák a számítógépes tomográfiában

A tomográfiás adatgyűjtés esetén kritikus pont a forgatás. Ha a forrás és detektorpár helyzete eltér az ideálistól, az hasonló hatással van a felvételre, mint amikor a páciens megmozdul a felvétel közben [52]. Emiatt, akárcsak egy mozgó téma fényképezése során, a kép minőségromlást szenved. Az ideális helyzet függ természetesen az adatgyűjtés módjától. A fentiekben az első generációs CT-k adatgyűjtését ismertettem, ekkor a gyakorlatban a pásztázást és forgatást kell úgy végrehajtani, hogy az megfeleljen a korábban ismertetett adatgyűjtési sémának (3.ábra, 5.c ábra), hiszen ekkor ad megfelelő eredményt a rekonstrukciós algoritmus. Ha a pásztázást végrehajtó egység elmozdul a pásztázás irányában a forgatás tökéletlen megvalósítása miatt, akkor ennek következtében a projekciók nem közös középponttal kerülnek rögzítésre és rekonstrukciós hibákat tapasztalunk [53]. A forgásközépponti hiba hasonló hatással van a harmadik és negyedik generációs CT-k és a preklinikai vizsgálatoknál használt mikroCT-k adatgyűjtésére is. A hiba kiküszöbölésére kalibrációt [54-57] és szoftveres korrekciót [58,59] szokás alkalmazni.

2.2.4. Számítógépes tomográfia alkalmazása optikai tartományban

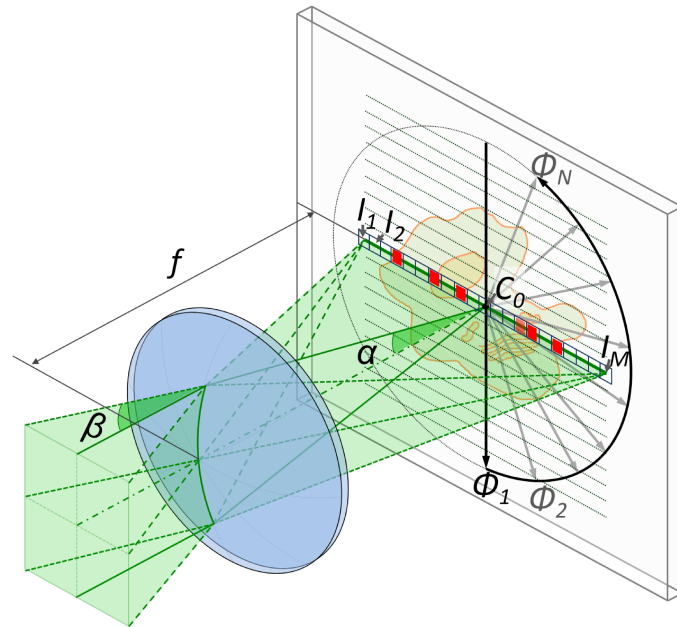
A tomográfiás megközelítés közvetlenül átültethető optikai tartományba. Az optikai projekciós tomográfiában (OPT) a CT-vel azonos geometriát követve több irányból átvilágítják a kiterjedt mintát, az átjutó fényt egy detektorsorral mérik, majd az így felvett szinogrammból rekonstruálják a minta belső szerkezetét [60-62]. Lényeges eltérés az OPT esetén a CT-hez képest, hogy optikai tartományban sokkal jelentősebb a diffrakció és a szóródás a mintán, ezért tipikusan nem szolgáltat optikai feloldási küszöbhez közeli információt. Az optikai tomográfiát elsősorban néhány centiméteres mérettartományba eső, áttetsző minták esetén alkalmazzák 3 dimenziós transzmissziós és fluoreszcens felvételek elkészítésére. Megemlítendő az OCT [63,64], az optikai tomográfia egy interferometrikus megvalósítása, amely nem a minta teljes átvilágítását célozza, hanem néhány milliméter mélységig alkot képet erősen szóró mintákról, általában biológiai szövetekről. Ehhez infravörös tartományba eső fényforrást alkalmaz annak érdekében, hogy nagyobb behatolási mélységet érjen el, mint egy konfokális mikroszkóp. Laterális feloldása azonban emiatt néhány mikrométer. Hasonló behatolási mélység érhető el kétfotonos mikroszkópiában [65], nagyobb feloldás, de a pásztázás miatt nagyobb képalkotási idők mellett. A mikroszkópiai módszerekhez közelebb álló TDM [66-68] interferometrikus módszert alkalmaz vékonyabb (milliméter nagyságrendjébe eső), áttetsző minták vizsgálatára. A fáziskontraszt mikroszkóphoz hasonlóan, a TDM is láthatóvá teszi a vizsgált minta törésmutató-változásait. Az eljárás tomografikus mivolta abban rejlik, hogy a mintáról részletes mélységi információt, azaz összességében egy 3 dimenziós képet szolgáltat.

A vizsgálatom tárgyát képező optikai tomográfiás mikroszkóp lényegesen eltér a fenti módszerektől. A tomográfiás módszert esetünkben arra használjuk, hogy a vonalpásztázó rendszerben, az átviteli függvény laterális síkban fellépő anizotrópiáját megszüntessük.

2.3. Vonalpásztázó tomográfiás mikroszkóp

A tomográfiás mikroszkóp alapkoncepcióját Gajdáty Gábor ismertette doktori disszertációjában [69], és bemutatta a reflexiós üzemmódban működő vonalpásztázó tomográfiás optikai mikroszkóp (LSTOM [E1,E2]) működési elvét, kísérleti felépítését. Igazolta továbbá, hogy LSTOM rendszerben a tomográfiás megoldás révén laterális feloldásjavulás mutatható ki egy hagyományos ponttal pásztázó konfokális mikroszkóphoz. A dolgozatom témáját képező tudományos eredmények ezen a rendszeren alapulnak, ezért az alapkoncepciót a következőkben ismertetem. Az LSTOM elvi jellegű képalkotási mechanizmusát az 6. ábrán láthatjuk.

Adott egy minta, amely a laterális kiterjedéséhez képest vékonynak ($<1\text{mm}$) tekinthető. A mintát egy tárgylemezzel párhuzamos, diffrakciólimitált vonallal világítjuk ki. A fókuszáló lencse (objektív) fókuszában vonal keletkezik, ha egy olyan nyalábbal világítjuk ki, amely egy adott irány mentén kollimált (Y), és a rá merőleges irányban (X) pedig összetartó vagy széttartó. Ekkor két lényeges szöggel jellemezhető a vonal. α a nyílásszög a lencse után az YZ síkban, amelynek szinusza a numerikus apertúrát adja, amely a feloldást határozza meg. β a lencse előtt mérhető nyílásszög XZ síkban, amely megadja, a vonal hosszát a fókuszban ($L = 2 \cdot f \cdot \tan \beta$).



6. ábra: LSTOM kivilágítási mechanizmusa

adja, amely a feloldást határozza meg. β a lencse előtt mérhető nyílásszög XZ síkban, amely megadja, a vonal hosszát a fókuszban ($L = 2 \cdot f \cdot \tan \beta$).

A vonal létrehozásához használható rés, illetve hengerlencse többféle elrendezésben [T1, T2, 5.4 fejt]. A kivilágításnak közelítenie kell az ideális vonalhoz, azaz teljes hossza mentén homogénnek, görbülettől mentesnek, és diffrakció-limitáltnak kell lennie, ellenkező esetben kép inhomogénné, torzulttá válik [69]. Ez szab határt annak is, hogy milyen mélységig vizsgálható egy adott minta, ugyanis a mintában való haladás miatt torzulhat a fázisfront.

A detektálás tomográfias mivolta abban rejlik, hogy a kivilágított térrészből induló fényt (I_1, I_2, \dots, I_M) nem képezzük le a hossza mentén pontról-pontra egy vonaldetektorra, mint egy vonalpásztázó mikroszkópban, hanem egy pontszerű detektorra történő lefókuszálás által az összegzett ($I = \sum_1^M I_i$) fényintenzitást mérjük. Ez felel meg a CT-s nyalábösszegnek, csak a transzmisszió helyére a reflexió, illetve fluoreszcens minta esetén az emisszió lép, és annak a térbeli eloszlását rekonstruáljuk, azaz esetünkben egy $M \times M$ -es képet. Ehhez M lépésben eltolva megismételjük az sugárösszeg (I) megmérését, rögzítve a projekciót, majd a vonalat és a pásztázási irányt forgatva rögzítünk N darab projekciót, amely a szinogramot adja.

A pásztázást galvo tükrökkel, azaz az optikai tengely, fókuszáló lencse előtti megdöntésével vagy a minta piezo tömbbel történő mozgatásával valósíthatjuk meg. Utóbbi immerzió esetén megfontolandó.

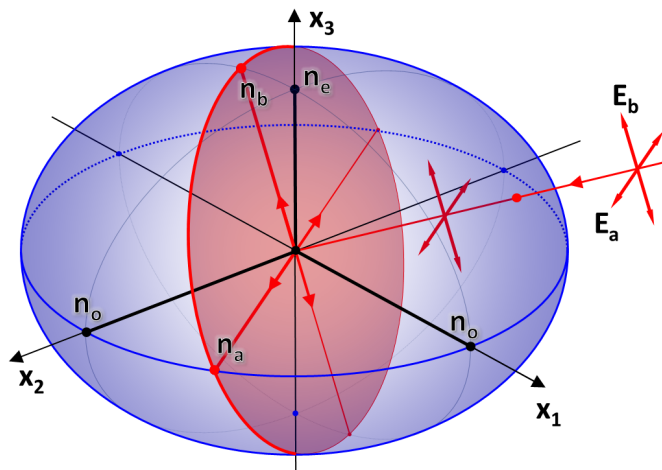
A vonal és a pásztázási irány forgatása a mintához képest több módon megvalósítható. Forgatható a tárgy egy hagyományos vonalpásztázó mikroszkóp fókuszában, de ez nagy numerikus apertúrájú objektívek használata mellett nem alkalmazható. Forgatható csak a vonal, miközben a pásztázást a minta megfelelő irányú eltolásával valósítjuk meg. Ehhez a vonalat létrehozó elemet, például egy hengerlencsét kell forgatni, és az eltolónak megfelelő pontosságúnak kell lennie. Ha térszűrést is meg szeretnénk valósítani, a hengerlencse fókuszába helyezett réssel, akkor a két elem együttes forgatása viszont problémás. Könnyen forgatható a vonal, ha egy kettőstörő kristály révén bevezetett asztigmia segítségével hozzuk létre. Ezt a módszert az 5.2 fejezetben ismertetem. A vonal és a pásztázási irány együttes forgatása képforgató optikai elemmel valósítható meg, például Pechan vagy Dove prizmával. Ezen elemek pontatlan beállítása azonban befolyásolja a képalkotást (a CT-hez hasonlóan 2.2.3), amelynek kapcsán felmerülő nehézségeket és megoldásokat az 5.1 fejezetben mutatom be.

A tomográfiai adatgyűjtés és a rekonstrukció miatt LSTOM esetén szem előtt kell tartani a CT-nél ismert hibaforrásokat, figyelembe véve, hogy LSTOM esetén a pásztázó vonal szélességét a diffrakció limitálja (míg a CT esetén a nyaláb szélessége többnyire elhanyagolhatónak tekinthető). Megfelelő számú projekció rögzítése szükséges ahhoz, hogy a rekonstruált képet ne terheljék artifaktumok. A 4.c ábrát tekintve látható, hogy a megfelelő $\Delta\phi$ szöglépés (well sampling) megválasztásának az szab feltételt, hogy ne kelljen a nagyobb k értékek esetén túl távoli pontokból interpolálni $F(k_x, k_y)$ értékeit (részletesebben lásd [49], aliasing). LSTOM esetén a különbség, hogy az LSF-fel történő konvolúció kiszűri a feloldási határhoz (R) tartozó határfrekvencia (k_R) feletti P értékeket, ezért kevesebb projekció is elegendő lehet, mint a CT esetén. A konvolúció miatti szűrés figyelembe vehető a FBP algoritmus alkalmazása esetén is, ugyanis a projekció (p) Fourier transzformáltjainak (P) azon értékeit felesleges megnövelni a $|k|$ -val történő szorzás révén, amelyeket P a k_R levágási frekvencia feletti k értékekre vesz fel, ugyanis mérési zaj jelenlétében ez csak a zaj nagyfrekvenciás tartományban történő növelését eredményezi. A szűrő módosításával a zajcsökkentés mellett a mellékmaximumok csökkentése is elérhető. A későbbiekben a FBP algoritmust az eredeti formájában fogjuk használni.

2.4. Anizotrópia

Számos kristályos anyag optikai anizotrópiát mutat, azaz optikai tulajdonságai függenek a rajta áthaladó fény polarizációjától és a terjedési irányától. Ez arra vezethető vissza, hogy adott kristályrácsban különböző irányokban az atomok között eltérő távolságok és eltérő kötőerők lépnek fel, ezért az elektronok gerjeszthetősége függ az elektromos tér irányától [70,71]. Az anyag és az elektromos tér közötti kölcsönhatás, az elektromos eltolás (\mathbf{D}) és az elektromos térerősség (\mathbf{E}) vektorok közötti konstitúciós összefüggések segítségével írható le. Lineáris, anizotróp közegben a két vektor között az ε elektromos permittivitás másodrendű tenzora teremt kapcsolatot: $\mathbf{D}=\varepsilon\mathbf{E}$ szerint. Megmutatható, hogy ε tenzor szimmetrikus [72], és ezért létezik olyan ortogonális transzformáció, amellyel diagonalizálható. Azaz $D_i=\varepsilon_i E_i$ ($i=1,2,3$), ahol ε_i állandók az ε tenzor sajátértékei, és a hozzájuk tartozó irányok a főtengek. A permittivitásból megadhatóak a főtengekhez tartozó törésmutatók $n_i=\sqrt{\varepsilon_i/\varepsilon_0}$ és fázissebességek $v_i=c/n_i$, ahol ε_0 a vákuum permittivitása, c a fénysebesség vákuumban. ε tenzor (és hasonlóan n , v) szemléletes reprezentációja egy másodrendű felület, egy ellipszoid, amely révén tetszőleges irányban megadható ε (illetve n , v) értéke. Az ε tenzor komponensei az adott kristályra jellemző anyagi állandók, amelyek tükrözik a kristály szimmetriáit is. Az ε tenzor sajátértékei segítségével osztályozhatóak a kristályok: $\varepsilon_1=\varepsilon_2=\varepsilon_3$ esetén izotróp és $\varepsilon_1\neq\varepsilon_2\neq\varepsilon_3$ esetén kéttengelyű kristályokról beszélünk.

A továbbiakban az egytengelyű kristályokra szorítokozom, amelyekben $\varepsilon_1=\varepsilon_2\neq\varepsilon_3$, azaz ezzel $n_1=n_2\neq n_3$. Szokásos a főtörésmutatókat egytengelyű kristály esetén $n_1=n_2=n_o$ ordinárius és $n_1=n_e$ extraordinárius törésmutatóknak nevezni. Továbbá $n_o>n_e$ esetén negatív, $n_o<n_e$ esetén pozitív egytengelyű kristályról beszélünk. A törésmutató geometriai reprezentációja egy forgási ellipszoid. Az ellipszoid 7. ábrán látható, a jobb láthatóság érdekében n_e és n_o aránya elnagyolt. Az ellipszoid forgástengelye (x_3) a kristály optikai tengelye, ami egyben a kristályrács szimmetriatengelye is. Ha tetszőleges irányból halad egy elektromágneses hullám a közegben, akkor az általa érzékelt

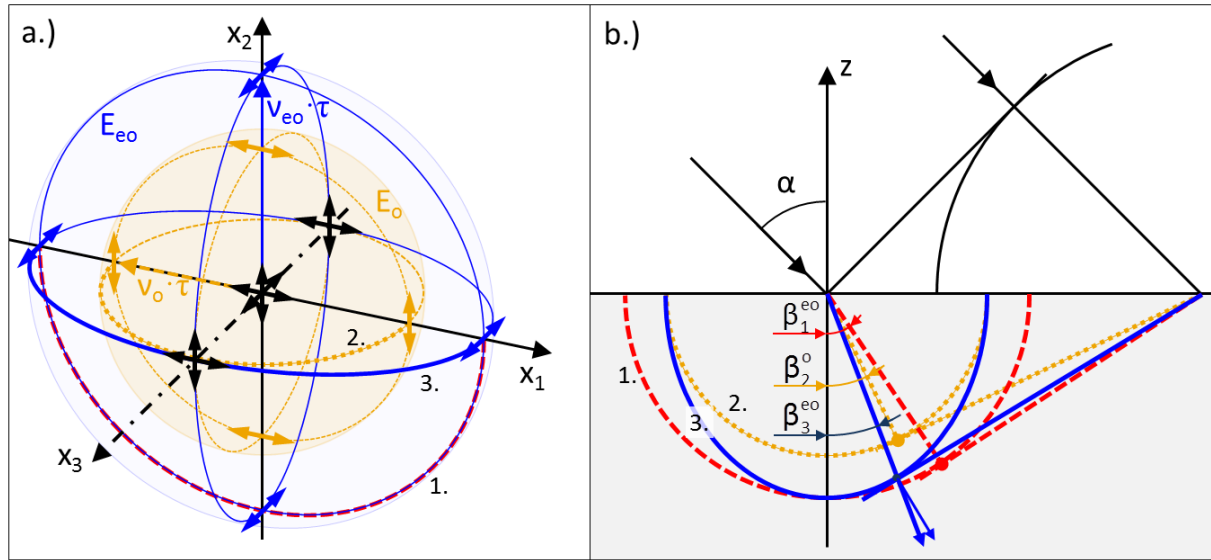


7. ábra: egytengelyű kristály törésmutató ellipszoidja

törésmutató ezen ellipszoid alapján számolható: az ellipszoidból a terjedési irányra merőleges sík egy ellipszist metsz ki, amelyen a térerősség vektor iránya kijelöl egy pontot, amely megadja a törésmutatót. Egy kitüntetett irányt képvisel az az eset, amikor a térerősség vektor az x_1x_2 síkba esik (\mathbf{E}_a), ekkor ugyanis a hullám beesési irányától függetlenül a törésmutató értéke: $n_a = n_o$. Ami azt jelenti, hogy erre a polarizációs irányra nézve a törésmutató izotróp. Innen ered az ordinárius nyaláb elnevezés. Az erre merőleges irányú módust szokás extraordináriusnak hívni. Kiemelendő az a speciális eset, amikor a fénycsugár az optikai tengely mentén halad, ekkor ugyanis a polarizációs iránytól függetlenül a törésmutató értéke n_o . Szokás a fenti két polarizáció szerint ordinárius és extraordinárius nyalábról beszélni, és úgy fogalmazni, hogy a rájuk vonatkozó törésmutatók megegyeznek az optikai tengely irányában (azaz az anizotrópia, kettős törés megszűnik).

A hullámelméleti megközelítésben ez a következőt jelenti [50,70]: ha a kristályon belül elhelyezünk egy pontforrást, akkor, míg az ordinárius polarizáció mellett (\mathbf{E}_o) a hullámfront egy gömb lesz, akárcsak egy izotróp közegben. Extraordinárius polarizáció esetén (\mathbf{E}_{eo}) a hullámfront egy forgási ellipszoid lesz, melynek forgástengelye az optikai tengely (x_3), azaz a metszete x_1x_2 síkban kör, míg x_2x_3 és x_1x_3 síkban ellipszis. Erre látható példa az 8.a ábrán, ahol egytengelyű negatív kristály fázisfrontját ábrázoltuk (elnagyolt n_o/n_{eo} aránnyal), az egyes polarizációk esetén: az ordinárius hullámfront fő metszeteit reprezentálja a sárga szaggatott, az extraordináriusét a folytonos kék. Megfigyelhető, hogy x tengely az optikai tengely, amely irányban a két fázisfelület érinti egymást, hiszen az azonos törésmutató miatt azonos $v_o = c/n_o$ sebességgel terjed a két nyaláb, míg az erre merőleges irányban az extraordinárius nyaláb fázissebessége $v_{eo} = c/n_{eo}$ lesz. A hullámfrontok ismeretében a Huygens-elmélettel magyarázható a kettőstörés és általában a fénytörés egy egytengelyű kristály esetén. Ekkor a kritikus kérdés, hogy milyen szöget zár be az optikai tengely a közegethatárral, hiszen az határozza meg a fázisfront alakját a közegben. Két speciális csiszolási mód említendő: ha az optikai tengely merőleges a felületre, akkor s-típusú, ha azzal párhuzamos, akkor p-típusú kristályról beszélhetünk.

Tekintsünk példaként egy törést, egy negatív egytengelyű p-típusú kristály felületén. Ekkor az 8.a ábrát tekintve a közeghatár x_1x_3 síkkal párhuzamos. Tekintsünk három törést három, azonos beesési szögre, de eltérő síkban és eltérő polarizációra: ordinárius nyaláb esik be x_1x_2 síkban (1.), továbbá extraordinárius nyaláb esik be x_1x_2 (2.), és x_2x_3 (3.) síkban. 1. és 2. esetben a közegben a fázisfelület metszete egy kör, ezért ekkor α és β_1^{eo} , illetve α és β_2^o szögek között fennáll a Snellius Descartes törvény. A 3. esetben a fázisfront x_2x_3 síkban a fázisfront metszete



8. ábra: elektromágneses hullám (a) terjedése egytengelyű kristályban, és (b) törése a kristály síkfelületén.

egy ellipszis, ezért α és β_3^{eo} szögek között nem áll fenn a Snellius Descartes törvény. Ahogy a szerkesztésből is látható β_3^{eo} kisebb lesz, mint β_1^{eo} és β_2^o , azaz a hozzátartozó n_x törésmutató nagyobb, mint n_{eo} és n_o , továbbá n_x függni fog a beesési szögtől. Az ábrán a fázisfrontok sugara a jobb láthatóság érdekében elnagyolt. Ha a később használt kalcitot vesszük példaként, akkor a törésmutatók 532nm-es hullámhossz esetén: $n_o=1,663$, $n_{eo}=1,488$ és a n_x az α beesési szögtől függően 1,79 és 1,859 között változik. Érdekes továbbá megjegyezni, hogy a 1, 3 megtört hullámok fázisfrontja közel azonos irányú, és hogy 3. esetén a terjedési irány lényegesen eltér a fázisfront normálisától.

Mivel p-típusú kalcit kristályban a felületre merőleges két (x_1x_2 és x_2x_3) síkban az extraordinárius nyaláb eltérő törésmutatót mutat, ezért átfókuszálva a kristályon [73] asztigmia vezethető be. Az asztigmia révén létrejövő vonal kivilágításra használható fel LSTOM mikroszkópban, amely alkalmazást az 5.2 fejezetben tárgyaljuk.

3. Célkitűzések

A célom a vonalpásztázó tomográfiás optikai mikroszkóp laterális feloldásának javítása és a képminőséget degradáló hibák vizsgálata és azok minimalizálása.

1. A képminőséget és a laterális feloldást jelentősen ronthatja a tomográfiás adatgyűjtés hibája, ami LSTOM esetén a képforgató prizma beállítási pontatlanságára és a prizmat forgató egység tökéletlen mivoltára vezethető vissza. Célom egy, az optikai rendszer paramétereitől és a vizsgált mintától független kritérium megfogalmazása, amely garantálja, hogy a rekonstrukciós hibák hatása kísérleti szempontból elhanyagolható legyen. Célom továbbá megvizsgálni elméleti és kísérleti úton, hogy a meghatározott kritérium egy adott kísérleti elrendezés esetén milyen feltételekkel, milyen beállítási pontosság mellett teljesíthető.
2. A rekonstrukciós hibák forrása a képforgató prizma, ezért célom egy azt helyettesítő kivilágítási módszer kísérleti alkalmazhatóságának vizsgálata. Egy kettőstörő lemez segítségével vezetek be asztigmatizmust a rendszerbe, és vizsgálom, hogy segítségével megvalósítható-e a kellő pontossággal a létrejövő vonal forgatása, tehát alkalmazható-e LSTOM mikroszkópban.
3. Célom az LSTOM mikroszkópot alkalmassá tenni fluoreszcens biológiai minták vizsgálatára. Ehhez szükséges a konfokális detektálás megvalósítása és a fényvesztések csökkentése. Megvizsgálom, hogy a változtatások befolyásolják-e a rendszer működését, és azt, hogy milyen optimalizálások lehetségesek LSTOM rendszerben.
4. Célom egy vonalpásztázó rendszer laterális feloldását növelni. Ennek érdekében fázismanipulációt hajtok végre a kivilágításon és ezzel egyidejűleg konfokális detektálást alkalmazok. Elméletileg vizsgálom a rendszer eredő vonalátviteli függvényét (LSF) befolyásoló rendszerparamétereket, továbbá vizsgálom a megoldás kísérleti alkalmazhatóságát. Célom a laterális feloldás kísérleti meghatározása és a módszer LSTOM-ban történő alkalmazhatóságának vizsgálata.

4. Anyag és módszer

Az LSTOM mikroszkóp esetén a laterális feloldás pontos számszerűsítésére lesz szükség annak érdekében, hogy össze tudjuk vetni a feloldás elméletileg várt értékeivel, és más mikroszkópok feloldóképességével. A lehetséges mérési és kiértékelési eljárásokat ismertetem az alábbiakban, és emellett a fluoreszcens vizsgálatoknál használt anyagok, minták néhány fontosabb tulajdonságát.

A dolgozatban az LSTOM rendszer több kísérleti megvalósítását fogjuk látni. Mivel elrendezésenként ugyanazt az adatgyűjtési, vezérlési és kiértékelési sémát alkalmaztam, és mert bizonyos kísérleti eszközök többször előkerülnek a dolgozatban, ezért ebben a fejezetben kiemelve foglalom össze paramétereiket és tulajdonságaikat.

4.1 Feloldás meghatározása, képminőség vizsgálata

Ahogy a bevezetőben tárgyaltuk, egy diffrakciólimitált aberrációmentes fókuszált vonal keresztmetszeti eloszlása (LSF) egy sinc^2 függvénnyel írható le, melynek maximuma és első minimuma között $R = 0.5 \cdot \frac{\lambda}{NA}$ távolság mérhető (λ a hullámhossz, NA a fókuszáló objektív numerikus apertúrája), ami a Rayleigh kritérium szerinti feloldást adja meg. A célunk R érték meghatározása. A pásztázó vonal intenzitás-eloszlásának mérése megvalósítható pontszerű objektumok alkalmazásával. Egy kiszemelt d átmérőjű objektum pontszerűnek tekinthető egy R feloldású rendszer számára, ha az R félértékszélességű sinc^2 eloszlással konvolválva az objektumot a kapott eloszlás félértékszélessége nem nagyobb lényegesen R -nél. Gömbszerű objektum esetén, ha annak átmérője 8, 25, 35 százaléka R -nek akkor a konvolúció után az R értékére rendre 0,1, 1, 2 százalékkal nagyobb értéket kapunk. Attól függően kell tehát megválasztanunk az objektumok átmérőjét és objektívet, hogy mekkora hibát tartunk elfogadhatónak. A mérésre alkalmas lehet egy nanorészecskéket ritkán tartalmazó minta, vagy egy litográfiai úton előállított pontszerű reflektáló felület [2, 75]. Reflexiós méréseknél ezüst nanorészecskéket alkalmaztunk, amelyek átmérője 10-50 nm körül változik.

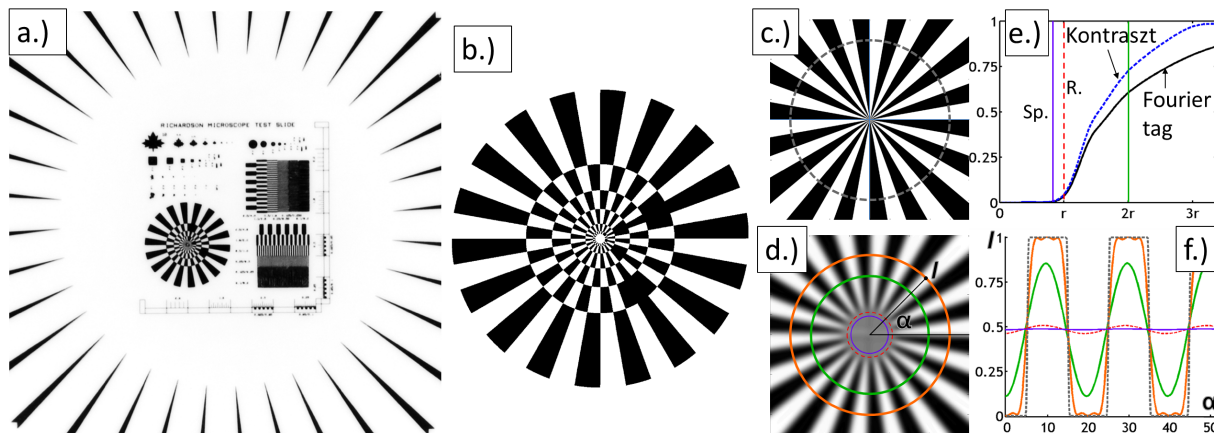
Az LSF megmérhető késéles módszerrel [74]. Ekkor egy reflektív, tökéletes pengét (nagy periódusú litográfiai rácsot) tolunk piezo eltolóval a fókuszba a vonalra merőleges irányból, és rögzítjük a pengéről reflektált összintenzitást. A pengéről ily módon kapott projekciót deriválva

az LSF-et kapjuk eredményül. Amennyiben a kivilágító vonal eltér az ideálistól, azaz félértékszélessége a hossza mentén változik, esetleg görbült, akkor egy átlagolt LSF-et kapunk.

A mért LSF illesztésével meghatározható R értéke. A gyakorlatban gyakran használatos a LSF félértékszélessége ($FWHM$). Mivel a $FWHM$ arányos R -rel, ezért használható a feloldás jellemzésére, de ügyelni kell arra, hogy a $FWHM$ nem a Rayleigh kritérium szerinti feloldást adja, hanem egy, a Sparrow kritérium által definiált távolsághoz közelebb eső értéket ad. Ha különböző módszerekkel vagy eltérő kísérleti paraméterekkel készítünk felvételeket, akkor a meghatározott Rayleigh kritérium szerinti feloldás értékét (R) praktikus normálni az alkalmazott hullámhosszal és a numerikus apertúrával, azaz kiszámolni k értékét.

A képminőség (aberrációk) vizsgálatára olyan (az optikai mikroszkópia számára) tökéletes kivitelezésű minták alkalmasak, amelyek geometriája pontosan ismert (a rendszer feloldásánál pontosabban ismert). Amennyiben a minta méretviszonyai is jól ismertek, akkor a feloldás is meghatározható, például litográfiai rácsra merőleges irányban felvett projekción mérhető modulációs mélység alapján. A Richardson tesztminta számos reflektáló (króm) objektumot tartalmaz széles mérettartományban ([75], 9.a ábra), köztük rácsokat, szabályos és szabálytalan geometriai alakzatokat és a Richardson csillagot. A Richardson csillagot több mérésünk során is használtuk. Sugárirányban 7 gyűrűből áll, amelyek határai rendre 40, 20, 13, 8, 4, 2, $1.30\ \mu\text{m}$ átmérőnél találhatóak, és ezeken a gyűrűkön belül körbehaladva 10 fokenként reflektáló és áttetsző szeletek váltakoznak. Kívülről a második, negyedik és hatodik gyűrűkben pozícionálásra alkalmas, három összefüggő reflektáló szeletből álló jelölés található. A csillag digitális képmása látható a 9.b ábrán.

Mivel a csillag a közepe felé egyre szűkülő rácsokból áll, ezért egy lehetséges kiértékelés, hogy a csillag közepétől adott r távolságra lévő képpontok értékeit (megfelelő interpolációval) kiemeljük egy adatsorba. Különböző r értékek mellett kiszámoljuk a rácsoak kontrasztját, vagy modulációs mélységét, és a kapott értékeket a sugár függvényében ábrázoljuk. Erre láthatunk példát a váltakozásokat nem tartalmazó Siemens csillag [4] esetén (9.c ábra). Ha a csillagot forgatva kiszámoljuk a projekciókat, és rekonstruáljuk a képet, akkor a 9.d ábrán látható képet kapjuk. A 9.c és d ábrákon jelölt körök mentén számolt metszeti görbét mutatja 9.f ábra, látható, hogy a kör közepe felé haladva a moduláció csökken. A 9.e ábrán látható a metszeti görbék alapján számolt kontraszt függvény. A Sparrow kritérium értelemben vett feloldás értéke azon sugár értékből számolható, amelynél a kontraszt nullává válik. Mivel a kontrasztfüggvény



9. ábra: (a) Richardson tesztminta, (b) Richardson csillag. Adott kör menti (f) moduláció meghatározásának illusztrálása (c) ideális és (d) konvolált Siemens csillag esetén. (e) Kontraszt változása a sugár függvényében. lassan közelíti meg a nulla értéket ezért a leolvasás mérési zaj jelenlétében pontatlan lehet. Mérési zajra kevésbé érzékeny, ha a rácsokat frekvenciatartományban vizsgáljuk. A kör menti moduláció frekvenciájához tartozó Fourier komponens amplitúdóját ábrázolva a sugár függvényében, a kontraszthoz hasonló görbét kapunk (9.e). Ha a leolvasás nem valósítható meg megfelelő pontossággal, akkor célravezetőbb a kontrasztfüggvények alapján összehasonlítani végezni. Két különböző módszerrel (eltérő mikroszkópokkal) mért, vagy mért és számolt kontraszt függvények ugyanis jól összehasonlíthatóak. Mindemellett, mivel a rácsok körbehaladnak, ezért jól mutatja a csillag, ha valamelyik irány mentén (valamelyik projekcióban) feloldáscsökkenés lép fel, illetve ha sérül a hengerszimmetria például a projekciók elcsúszása miatti rekonstrukció hibája miatt (lásd 5.1.2 fejezet).

Kevésbé szabályos minta esetén a Fourier analízis alkalmazható a szinogramra és a rekonstruált képre egyaránt, mindkettő alkalmas lehet a levágási frekvencia meghatározására. A szinogram projekciónkénti Fourier vizsgálata esetén szögfüggő hibára derülhet fény. Az MTF-en alapuló kiértékelés eredményesen végezhető nanorészecskéket véletlenszerűen tartalmazó mintákról felvett projekciókon. A pontszerű objektumok véletlenszerű elhelyezkedése miatt a frekvencia-átviteli függvény jól meghatározható. Minden esetben érvényes, hogy a feloldás meghatározási pontossága nagyban függ a méréseket terhelő zaj mértékétől, így annak minimalizálása a gyakorlatban mindenképp fontos célkitűzés volt.

Fluoreszcens vizsgálatoknál festett polisztirol gömböket, és egy *Convallaria majalis* tesztmintát alkalmaztuk. A Polysciences által gyártott Fluoresbrite polisztirol gömbök átmérője 200nm, négyféle festékkel vannak megfestve, ezek közül a Phycoerythrin gerjeszthető az

LSTOM elrendezésekben alkalmazott 532nm-es lézerfényvel, és emissziós maximuma 554nm. Megfelelő hígítás mellett kellőképpen ritka minta állítható elő, de a tapasztalat azt mutatta, hogy a gömbök hajlamosak összetapadni. A gömbök összetapadása csökkenthető volt, ha víz helyett etanollal hígítottuk a gömbök vizes szuszpenzióját, és ultrahangos kádas kezelés után spin-coatinggal vittük fel őket a tárgylemezre. Emellett megkíséreltük SU8 ragasztóban történő fixálásukat is, de az SU8 autofluoreszcenciája miatt nem volt használható a megoldás. A Zeiss által forgalmazott Convallaria majalis tesztminta a Májusi Gyöngyvirág gyöktörzséből tartalmaz egy közelítőleg 12 μ m vastag szeletet. A preparálása egyedi [76], amely gyakorlatilag minden hullámhosszon gerjeszthető igen stabil mintát eredményez. Hátránya, hogy a kezelés elsősorban a sejtfalakat teszi autofluoreszcenciára képessé, a kisebb részletek, mint sejtmagok halványabban világítanak, ezért képminőség vizsgálatára alkalmas, de feloldás meghatározására nem.

4.2 Mérésvezérlés, adatgyűjtés és kiértékelés

Tekintve, hogy bizonyos elemek több elrendezésben is szerepelnek, ezért azok típuskódjait, jellemző paramétereit az alábbiakban előzetesen összefoglaljuk.

Mindegyik kísérleti elrendezésben egy diódapumpált frekvenciakétszerezett Nd:YAG lézer (Roithner DPSSL-532) szolgált fényforrással. A lézer folytonos üzemű, 5V TTL jellel 30 kHz-ig modulálható, és maximális teljesítménye 40mW. A lézerforrásból származó infravörös fény szűrésére minden esetben alkalmaztunk egy 532 \pm 10nm vonalszűrőt (Thorlabs FL532-10). Ezen lézer szűrt fényét fogom a későbbiekben *lézerforrásként* hivatkozni.

A pásztázáshoz használt *galvo* motor (GSI Inc.) tükre segítségével ± 20 fokos szögtartomány pásztázható 6,1 $\cdot 10^{-4}$ fokos lépésközzel. Mérések alapján azt találtam, hogy a motor 2ms alatt veszi fel pontosan a nominális pozícióját. Ez azt jelenti, hogy a galvo léptetése egy 256x256 kép rögzítéséhez 1,5 perccel járul hozzá. Ha a mérés engedi, akkor a motor túlhajtható, ekkor 0,6ms alatt felveszi az új pozícióját, de a projekciókon hiszterézis jelei figyelhetők meg. A galvo motorok vezérlőegységével történő kommunikációt úgy optimalizáltam, hogy az ahhoz szükséges idő (0,15ms) ne limitálja a mérést.

A minta pozicionálására, és bizonyos esetekben a pásztázás megvalósításához használt closed-loop *piezo eltoló* (PI NanoCube E-710, PZ 118E) három irányban képes 100 μ m tartományon 5nm legkisebb lépéssel elmozdulni. Pozicionáláskor a kívánt pozíciót a megadott pontossággal felveszi, de azt találtuk, hogy hosszútávon hőmérsékletváltozás hatására kimozdulhat abból. Továbbá gyors pásztázásnál hiszterézist tapasztaltunk.

Minden kísérleti elrendezés esetén az adatgyűjtés hasonlóan zajlott. Mivel a lézerforrás intenzitásában ingadozás volt megfigyelhető, ezért a lézer fényének intenzitása rögzítésre került referencia jelként. Ehhez és az 5.2 fejezetben ismertetésre kerülő in-situ korrekcióhoz szilícium detektort használtam, a mintáról érkező fényt hagyományos reflexiós LSTOM módban egy szilícium detektor, konfokális és fluoreszcens módban pedig egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) mérte. A szilícium alapú detektor minden esetben a Thorlabs DET36A volt. A PMT egy Hamamatsu által gyártott R928 típusú cső, melynek érzékenységi tartománya 185-900nm, maximális erősítése 10^7 , sötétárama alacsony (3nA). A méréseknél Lock-in technikát alkalmaztunk a zajok csökkentésére, ehhez a lézert 10 kHz frekvencián moduláltuk, és a detektorok jelét egy saját készítésű elektronika dolgozta fel, erősítve a jelet és levonva a DC tagot. A jelek szimultán digitalizálását egy NI PXIe-6356 típusú adatgyűjtő kártya végezte, 1,25 MS/s mintavételezési sebességgel. A jel/zaj viszonytól függően választottuk meg a beolvasott periódusok számát, de az adatgyűjtés ideje egy tipikus esetben, 256x256 kép esetén ≈ 3 perccel járul hozzá a mérési időhöz. A forgatással együtt egy gyors felvétel néhány perc alatt készül el (256x256 esetén ≈ 5 perc), míg egy részletesebb felvétel rögzítése akár 10-30 percig is eltarthat. Az NI PXIe-6356 kártya rendelkezik digitális ki és bemenetekkel, ezért a galvo motorok, az alkalmazott shutterek, és a retarderek vezérlését is azzal valósítottam meg. Az adatgyűjtést, vezérlést, kalibrációkat, stabilizálási feladatokat Labview környezetben implementáltam.

A munkám során több CCD és CMOS kamerával dolgoztam. Egy Tamaya CCD jelét az NI elektronika segítségével olvastam be, és használtam fel interferogram rögzítésére. Emellett a pozicionáló mikroszkópokban, és a vonalpásztázás detektoraként egy SONY kamerát és egy Hitachi kamerát használtam, amelyek jelét ASUS tuner kártya segítségével olvastam be. A SONY XC75CE kamera fekete fehér, érzékelő mérete 6,45mmx4,84mm, pixelmérete 8,4 μ m x 9,8 μ m. A Hitachi KP-M22 típusú kamera a SONY-val azonos érzékelőt használ, előnye, hogy kisebb tokozása révén a 30mm-es optikai ketrec rendszerbe befér. A fluoreszcens keresőmikroszkópban egy érzékenyebb színes USB2.0 CMOS kamerát (Thorlabs DCC1645C) használtam detektorként, melynek érzékelője 4,61mmx3,69mm, pixelmérete 3,6 μ m x 3,6 μ m. A gyakorlati alkalmazásoknál nem jelölöm meg az eszköz adatait, hanem az eredményeket távolságadatokkal közlöm.

A szimulációkat és a mérési eredmények kiértékelését Matlab és Labview programok segítségével végeztem.

5. Új Tudományos eredmények

Az alábbiakban ismertetem az általam elért új tudományos eredményeket. A fejezet 4 részre tagolódik a 4 tézispontnak megfelelően.

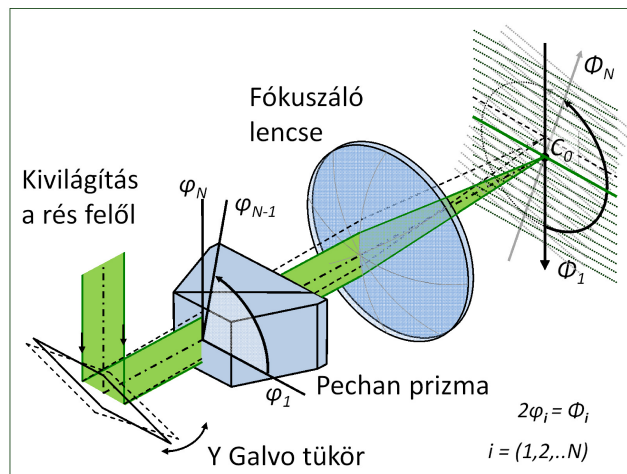
5.1. Forgatási hiba vizsgálata LSTOM rendszerben

Tomográfiás adatgyűjtés esetén kritikus pont a forgatás (2.2.3), ezért részletesen vizsgáltam, hogy milyen hatással van a prizmával történő forgatás az LSTOM mikroszkóp képalkotó mechanizmusára.

5.1.1. Tomográfiás adatgyűjtés LSTOM rendszerben

Az 10. ábra mutatja az ideális adatgyűjtést LSTOM rendszerben. Egy rés által létrehozott hengerhullámot fókuszálunk le egy lencsével. A létrejövő diffrakciólimitált vonal pozícióját a

galvo tükör segítségével változtatva pásztázunk végig a mintán, és a reflektált vagy emittált fény összintenzitását mérjük egy detektorral. Így kapjuk az Φ_i irányú projekciót. Mivel pásztázást alkalmazunk, ezért ki kell jelölnünk egy rögzített optikai tengelyt, amelyre centráltnan felfűzzük a galvo tükröt követő optikai elemeket. Ehhez kiválasztunk egy alkalmas dőlésszöget (ϑ_0), amit a továbbiakban középállásnak fogok

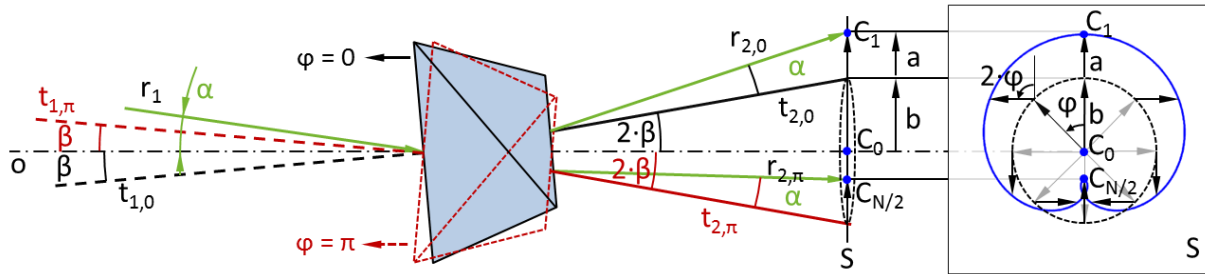


10. ábra: tomográfiás adatgyűjtés megvalósítása

hívni. A tükrök középállása mellett kijelölt optikai tengelyt fogom az ideális optikai tengelynek hívni, és annak a fókuszsíkkal vett metszéspontját pedig C_0 -lal fogom jelölni. A projekciók felvétele úgy történik, hogy $2 \cdot M + 1$ darab intenzitásértéket rögzítünk a tükörrel a középállás (ϑ_0) körül $\Delta\vartheta$ -val lépkedve, $[\vartheta_{0,y} - M \cdot \Delta\vartheta, \vartheta_{0,y} - (M - 1) \cdot \Delta\vartheta, \dots, \vartheta_{0,y} + M \cdot \Delta\vartheta]$ pozíciókban. Ezt követően egy képforgató prizmat forgatva $[\varphi_1, \dots, \varphi_N] = [0 \dots 90^\circ]$ szögtartományban, elforgatjuk a pásztázás irányát ($\Phi_i = 2\varphi_i$). A szögeket a függőleges síkhoz képest tekintjük. Ideális esetben ϑ_0 középállás mellett az optikai tengely C_0 pontban metszi a fókuszsíkot, bármely φ_i prizmaállás esetén, azaz C_0 adja az adatgyűjtés polárkoordináta-rendszerének középpontját.

Beállítási hibák felvezetése

Az ideális tomográfiás adatgyűjtés nem valósul meg azonban, ha a képforgató prizma geometriai tengelye nem esik egybe az optikai tengellyel. Ekkor ugyanis a prizma el fogja téríteni az optikai tengelyt a kidöntöttségétől és decentráltóságától függően [77], ami képrekonstrukciós hibákhoz fog vezetni. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy akár a prizma helytelen rögzítése, akár a forgató egység rögzítési vagy forgatási hibája miatt eltérülhet az optikai tengely. Helyes rögzítés (beállítás) és helyes forgatás alatt azt értjük, hogy bármely φ_i forgató állás esetén a prizma és prizmaforgató egység tengelyei tökéletesen egybeesnek az optikai tengellyel. Ettől eltérés jelentkezik, ha nem tudjuk a megfelelő beállítást garantálni a tengelyek részére, vagy ha a forgató egység nem forgat ideálisan. Utóbbi alatt azt értjük, hogy körülforduláskor a forgatóegység álló részének geometriai tengelyéhez képest a forgó részének tengelye enyhén megdől, vagy a két rész a tengelyre merőleges síkban elmozdul egymáshoz képest [78]. Ez értelemszerűen megdönti, illetve eltolja a prizmát. Az eltéréseket jellemző mennyiségek (szög, elmozdulás) több körülfordulás esetén közel állandó értéket vesznek fel (szinkron hiba), de ezen értékek a forgató minőségétől függően kisebb-nagyobb mértékben véletlenszerűen változhatnak többszöri körülfordulás esetén (aszinkron hiba).



11. ábra: a képforgató prizma és a forgástengely megdöntésének hatása az optikai tengelyre

Szemléltető példaként tekintsük a 11. ábrán vázolt esetet. Az egyszerűség kedvéért érdemes a forgatóegység tengelyét (o) rögzítettnek tekinteni, amihez képest α szögben érkezik egy fénynyaláb (r_1), és a prizma tengelye (t_1) pedig β szögben van megdöntve. Feltételezzünk egy tökéletes forgatót, azaz forgáskor β konstans, azaz t_1 egy kúpfelületen mozog. A forgató $\varphi=0$ és $\varphi=\pi$ állása mellett ábrázoltam sematikusán a prizmát, és a tengelyeket. Ezen pozíciókban a prizma tengelyét $t_{1,0}$ és $t_{1,\pi}$ jelöli. A prizma e két állása mellett a tengelyéhez képest valamely δ szög alatt beeső nyalábot a tengelyéhez képest $-\delta$ szöggel térít el. Azaz végeredményben a prizma tengelyéhez képest $\varphi=0$ állás mellett $\beta+\alpha$ és $\varphi=\pi$ állás mellett $\beta-\alpha$ szögben beeső nyalábot a prizma tengelyéhez képest ugyanakkora és ellentétes irányban téríti el. A forgástengelyhez (o)

képest mérve a szögeket ez azt jelenti, hogy a prizma az α szög alatt beeső r_1 nyalábot $2\beta+\alpha$ és $-2\beta+\alpha$ alatti szögben téríti el. Ha a prizmat körbeforgatjuk ($[\varphi_1, \dots, \varphi_N]=[0..2\pi]$), akkor a prizma után a t_2 egyenes egy 2β nyílásszögű kúppaláston mozog φ szerint, miközben az r_2 egyenes nutációs mozgást végez 2φ szerint t_2 körül. Az r_2 nyaláb a forgástengelyre (o) merőleges S síkot az egyes φ_i prizmaállások mellett C_i pontokban metszi. A C_i pontok által az S síkban rajzolt görbe látható az ábra jobb oldalán. A görbe egy Pascal-féle csiga (limacon), amely polárkoordinátákban az alábbi egyenlettel definiálható [79]:

$$r(\theta) = 2a \cdot \cos \theta + b \quad (5.1)$$

Ahogy az ábra is érzékelteti, az a és b paraméterek paraxiális közelítésben arányosak α és β szögekkel, ezért célunk a görbe néhány pontját rögzíteni és azokból meghatározni a és b paramétert, amelyeket a forgatóegység és a prizma tengelyének pontosabb beállításhoz használhatunk fel. A gyakorlatban egy CCD-vel közvetlenül rögzíthetőek a limacon pontjának Descartes koordinátái adott φ prizmaállások mellett. A méréssel kapott $x_m(\varphi_i)$ és $y_m(\varphi_i)$ koordinátának illesztéséhez a limacon alábbi alakban felírt parametrikus egyenletei a legalkalmasabbak kiindulópontként: ,

$$x(\varphi) = a + b \cdot \cos \varphi + a \cos 2\varphi \quad (5.2)$$

$$y(\varphi) = b \cdot \sin \varphi + a \sin 2\varphi \quad (5.3)$$

Figyelembe kell vennünk néhány tényezőt, hogy a mért x_m és y_m függvények illesztéséhez a megfelelő modellfüggvényt megkapjuk. Egyrészt, mivel a polár- és Descartes-koordinátarendszer középpontjai nem esnek egybe, ezért egy konstans taggal (d) kell bővítenünk a modellfüggvényt, amely tagba beolvad az a tag az x irány esetén. Másrészt, mivel a két koordinátarendszer tengelye általában nem esik egybe, ezért egy-egy fázistagot (φ_1, φ_2) kell hozzáadni az argumentumokhoz. Továbbá figyelembe véve, hogy $\cos(\varphi) = \sin(\varphi + \pi/2)$, az x_m és az y_m függvény illesztésére egyaránt alkalmas modellfüggvény alakja:

$$f(\varphi) = b \sin(\varphi + c_1) + a \sin(2\varphi + c_2) + d \quad (5.4)$$

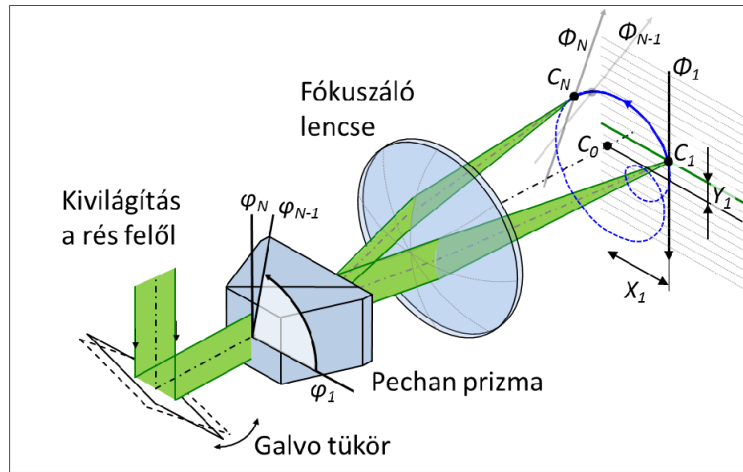
A szinkron hiba hatása magasabb rendű harmonikus tagokkal vehető figyelembe az illesztésnél:

$$f(\varphi) = b \sin(\varphi + c_1) + a \sin(2\varphi + c_2) + \sum_{k=3}^N e_k \sin(k\varphi + c_k) + d \quad (5.5)$$

Azaz a f függvény Fourier sorát kell kiszámolnunk, mivel x_m és y_m a forgatás révén 2π szerint periodikus. A kapcsolódó mérések ismertetésére a későbbiekben kerül sor.

Beállítási hiba hatása a projekciókra

Vizsgáljuk meg a továbbiakban, hogy az ismertett hibák milyen hatással vannak a tomográfias adatgyűjtésre és ezáltal a rekonstrukcióra LSTOM rendszerben. A fentiek szerint tehát, ha a három tengely (optikai, prizma és forgató) nem esik egybe, akkor a prizma után az optikai tengely eltérül (12. ábra) és az a fókuszsíkot az ideális C_0 pont helyett C_i pontokban metszi az egyes $[\varphi_1, \dots, \varphi_N]$ prizmaállások esetén. Az eltolás mértékét C_0C_i vektor segítségével jellemezhetjük, amelyet két komponensre bonthatunk: az aktuális, Φ_i -vel jellemezhető pásztázási iránnyal párhuzamos (Y_i) és arra merőleges



12. ábra: optikai tengely eltéréseinek hatása a projekciók felvételére (X_i) komponensekre. Az X_i komponens abban az esetben befolyásolja a képalkotást, ha nagysága összemérhető a pásztázó vonal hosszával. Ekkor ugyanis a látómező szélét nem világítja ki a vonal, és a rekonstruált képen az a rész elhalványodik, elmosódik. Az Y_i komponens sokkal fontosabb, mert aránylag igen kis hiba (laterális feloldás tört része) is igen nagy hatással van a rekonstruált képre. Ennek a hibának a hatását vizsgálom a szimulációs fejezetben, amihez ismernünk kell Y_i függvény alakját.

Ahogy az előző fejezetben felvezettem a helytelenül beállított prizma esetén $[C_1, \dots, C_N]$ pontok egy limacont alkotnak, amelyet torzíthatnak a forgató hibái. Az Y komponens C_0C_i vektorból számolható, és illesztéséhez a korábbi (5.5) modellfüggvénnyel azonos alakú függvény használható:

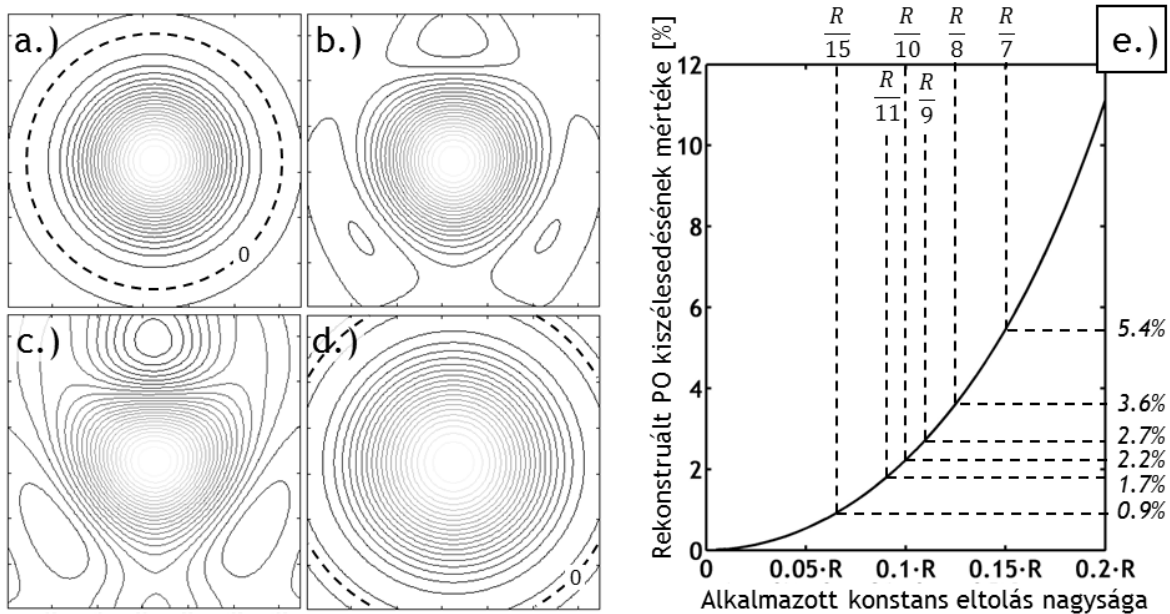
$$Y(\varphi) = A_1 \sin(\varphi + c_1) + A_2 \sin(2\varphi + c_2) + \sum_{k=3}^N A_k \sin(k\varphi + c_k) + d \quad (5.6)$$

ahol A_j amplitúdók, c_j fázis tagok, és d konstans ($j=1,2,\dots,N$). A második tag úgy hat a rekonstruált képre, hogy eltolja azt, így hatása elhanyagolható lesz. Az A_1 és b illetve A_2 és a paraméterek közvetlen kapcsolatban állnak egymással. A forgató lehetséges szinkron hibáját veszik figyelembe a magasabb rendű ($k \geq 3$) harmonikus tagok. Az alábbiakban megvizsgáljuk, hogy milyen hatással van a képre az Y függvény.

5.1.2. Szimulációk

A projekciók eltolását okozó hibakomponens (Y) hatását vizsgáltam pontszerű objektum (PO) és a Richardson Csillag (RCs) esetén (4.1 fejezet). A projekciókat 180 fokos szögtartományon $0,5^\circ$ szögelfordulás mellett számoltam ki (egy dimenziós konvolúciót követő felösszegzéssel), és bizonyos megnevezett esetekben 360 fokos szögtartományon, ahogy az CT és μ CT alkalmazásoknál is általában szokásos [52,59]. LSTOM esetén azért alkalmazunk 180 fokos adatgyűjtést a gyakorlatban, mert ekkor a szinogram tartalmazza a szükséges információt, de csökken az adatgyűjtési idő. A számolt szinogramokat FBP algoritmussal rekonstruáltam.

PO esetén a pásztázás lépésköze a feloldási határ (R) $1/50$ -ed része. A rekonstruált képek azonos skálázású, 128×128 méretű kontúrábrákon láthatóak (13.a-d). 13.a kép a PO hibamentes szinogramjából rekonstruált képet mutatja, míg a b és c esetben konstans eltolást (d) alkalmaztam. A konstans eltolás b esetben $R/10$, ami azt jelenti, hogy minden projekciót eltoltam 5 pixellel. Ez igen kismértékű aszimmetriát okoz, ellentétben a c. esetben alkalmazott $R/3$ eltolással, ami nem tolerálható mértékű degradációhoz vezet.

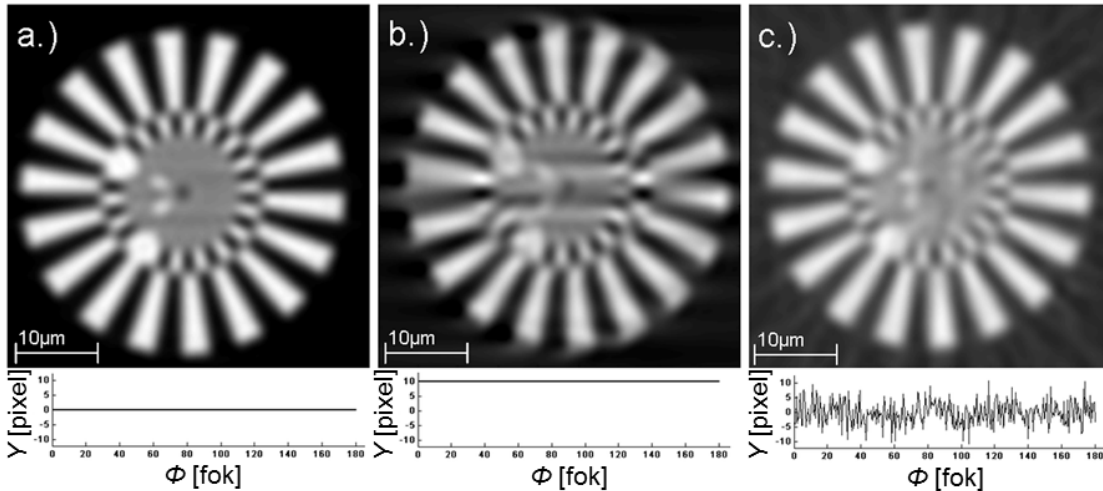


13. ábra: rekonstruált PO (a) hibamentes, (b) $R/10$ DC eltolás, (c) $R/3$ DC eltolás, (d) $R/3$ DC eltolás 360° adatgyűjtés mellett. (e) konstans eltolás hatása a feloldásra.

Az $R/3$ hiba esetén tapasztalt aszimmetria megszűnik, ha az eltolást a 360 fokos szögtartományon felvett szinogramra alkalmazzuk, és azt rekonstruáljuk. Viszont ebben az esetben jelentős a PO képének kiszélesedése, ugyanis a feloldás 31%-kal csökken! A mikroszkópai alkalmazás szempontjából a kérdés, hogy mekkora hiba esetén tolerálható a

feloldáscsökkenés. Az 12.e grafikon mutatja PO esetén bevezetett konstans eltolás okozta feloldásvesztést. Mivel a b. ábrán látható aszimmetria elhanyagolhatónak tekinthető, és főként, mert a gyakorlatban általában a feloldás 2%-nál pontosabban nem határozható meg (a mérési zajból vagy a mért LSF modellfüggvénytől való eltéréséből származó illesztési pontatlanság miatt), ezért a 2,2% hibát bevezető $R/10$ -es limitet választottam hibahatárnak.

Az alábbi szimulációban a laterális feloldás (R) $1/18$ -ad részével mintavételeztem a $0,5$ fokenként digitálisan legenerált csillagot és számoltam ki a szinogramot, majd rekonstruáltam FBP algoritmussal. Ez a következő kísérleti paramétereknek felel meg: megvilágítás hullámhossza $\lambda=532$ nm, fókuszáló objektív numerikus apertúrája $0,1$ és a pásztázás lépésköze $0,15\mu\text{m}$. A paraméterválasztást az motiválta, hogy ekkor a legkifejezőbbek a csillagon



14. ábra: Szimulált Richardson csillag; (a) hibamentes rekonstrukció; (b) konstans eltolás (DC); (c) random hiba $\mu=0$, $\sigma = R/5$ esetén

tapasztható hibák. A számolt feloldáscsökkenés mértéke azonban független a választott numerikus apertúrától. A rekonstruált RCs alatt látható a szinogramra alkalmazott hibafüggvény.

Az 14.a képen látható a hibáktól mentes rekonstruált csillag, míg a b esetben konstans eltolást alkalmaztunk a szinogramra, amelynek nagysága 10 pixel. A csillagon ekkor komoly torzulások (karok összeolvadása, szellemvonalak) figyelhetők meg, amelyek már nem tolerálhatóak. $R/10$ nagyságrendű hiba esetén a csillagon, a PO-hoz hasonlóan, kis aszimmetria és feloldásvesztés figyelhető meg. Konstans hiba esetén a torzulások miatt a feloldás kevésbé pontosan számolható, ezért erre az esetre az analízist nem végeztem el.

14.c ábra mutatja a véletlenszerű ($\mu=0$, $\sigma=R/5$ pixel) eltolás okozta képminőség romlást, amit gyakorlatban a prizmat forgató egység vezethet be. A kép homályossá, inhomogénná válik

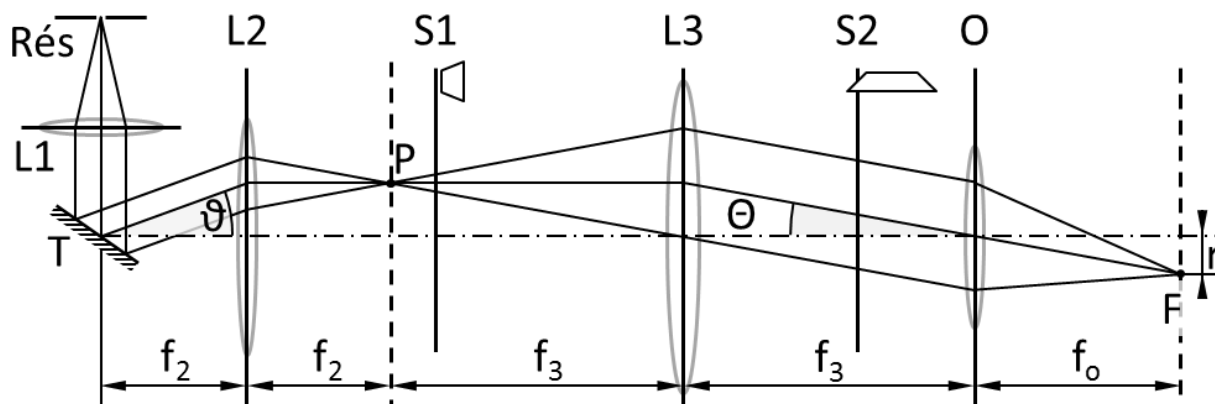
és csökken a feloldása is. Amennyiben a projekciókra alkalmazott véletlenszerű eltolás szórása $R/18$, $R/9$, $R/6$, akkor a relatív feloldáscsökkenés rendre: +0,5%, +2,5%, +6%. A kapott értékek illeszkednek a korábban kapott trendhez.

Összességében tehát elmondható, hogy az $R/10$ -es limit bár önkényesen választott, de tekinthető egy jó célkitűzésnek, ami a mérés kivitelezésének pontosságát illeti.

Kapcsolódó optikai számolások

A szimulációk során a rekonstrukciót befolyásoló hibát a fókuszban jellemeztük, és a mennyiségeket pixelértékben adtuk meg. Ez praktikus, mert az eredmények függetlenek az optikai rendszer jellemzőitől. A szimulációk eredményét azonban át kell ültetnünk egy kísérleti LSTOM rendszerbe, azaz meg kell néznünk, hogy az $R/10$ feltétel milyen geometriai kritériumoknak, milyen beállítási pontosságnak felel meg. Ehhez néhány számolást végeztem el, részben OSLO[®] optikai tervező programmal. A használt OSLO-s modell az alapvető LSTOM rendszert ([E1], 15. ábra) írja le: tartalmazza a kivilágítást, pásztázást, forgatást, alkalmas a tomografikus adatgyűjtés szimulálására, és az Y hibafüggvény kiszámolására adott beállítási hibák bevezetése mellett. A modellt közösen készítettük Gajdáty Gáborral, aki dolgozatában közölt kapcsolódó eredményeket [69]. Én a modellt elsősorban a prizma és forgató beállítási pontatlansága révén előidézett hibák, és azok Y függvénnyel való kapcsolatának vizsgálatára használtam. Azt találtam, hogy az (5.6) modellfüggvény által szolgáltatott amplitúdó- és fázisértékekből egyértelműen kiszámolható, hogy a prizma és a forgató tengelye milyen irányban és mekkora mértékben tér el az optikai tengelytől. Ennek ismeretében Y mérésével a prizma pontosabban beállítható. Emellett a későbbiekben a geometriai optikán túllépve a modellben alkalmazott tökéletes lencsét valós lencsére cseréltem, és vizsgáltam a szférikus és kromatikus aberráció hatását a rendszerben.

A modellben (15. ábra) a résen keresztül érkező fényt $L1$ lencse kollimálja. Egy gyakorlatban alkalmazott pásztázó rendszer abban tér el a korábban (10. ábrán) ismertetett sematikus elrendezéstől, hogy a galvo tükrök mögé egy lencsepárt ($L2$, $L3$) helyezünk el, amelyek közös fókuszúak, és $L2$ elős fókuszában helyezkedik a pásztázó tükör, $L3$ hátsó fókuszában a fókuszáló lencse (objektív, O). Így elérhető, hogy pásztázáskor minimálisan mozogjon a nyaláb a fókuszáló objektív belépő apertúráján. Pásztázáskor az objektívre eső nyaláb iránya (Θ) határozza meg a fókuszált vonal pozícióját (r) a fókuszban: $r = f_o \cdot \tan \Theta$. A nyaláb iránya a tükör által bevezetett megdőléstől és a teleszkóp nagyításától függ:



15. ábra: vonallal pásztázó tomográfiás rendszer modellje

$\Theta = f_2 / f_3 \cdot \vartheta$. Elsőként keressük azt a kritikus dőlésszöget (Θ_{KR}), amely a fókuszban $R/10$ eltolást eredményez. A kritikus szöget az alkalmazott objektív nagyítása (azaz fókusz távolsága) és numerikus apertúrája ($\sim 1/R$) határozza meg adott hullámhossz és ' k ' paraméter esetén. Mivel a nagyítás és a numerikus apertúra aránya objektívenként változik, ezért (27 Olympus objektív adataira alapozva) Θ_{KR} értéke $1,5 \cdot 10^{-4}$ fok és $8 \cdot 10^{-4}$ fok között változik. Nagyobb nagyítások esetén tipikusan nagyobb kritikus szög tartozik $R/10$ -hez, ami kedvező, mert nagy felbontóképesség esetén lesz kevésbé szigorú a feltétel. Másfelől viszont, feloldásjavító módszerek alkalmazása esetén ($k < 0,5$) R csökkentésével Θ_{KR} értéke is csökken.

A képforgató prizma elhelyezhető S1 vagy S2 síkban. A későbbiekben két megvalósításról fogunk beszélni, L3 lencse előtt fogunk alkalmazni egy pechan prizmat, és L3 lencse mögött egy Dove prizmat. Ha S2 síkban helyezkedik el a prizma, akkor annak megdőlése lesz kritikus. Ugyanis, ha a prizmat β szöggel megdöntjük, akkor az a nyalábot 2β szöggel dönti meg, módosítva ezzel a beesési szöget ($\Theta = \Theta + 2\beta$). Tehát ebben az esetben a prizmat $0,5 \cdot \Theta_{KR}$ pontosan kell beállítani. Ha L3 előtt helyezkedik el prizma, akkor a prizma decentráltasága lesz kritikus. A prizma eltolása ugyanis, virtuálisan eltolja P pontot, és ezzel F -et. Szám szerint például: ha $f_3 = 300\text{mm}$ és a prizmat $1\mu\text{m}$ -nal eltoljuk, akkor az ($\approx 0,0004^\circ$) dölést idéz elő L3 lencse mögött. Ekkora fókusz távolságú lencse használata mellett a fenti kritikus dőlésszögnek $0,7\text{-}4\mu\text{m}$ eltolás felel meg L3 lencse előtt. A prizma megdöntésének hatása minimalizálható, ha belépő apertúráját L2 fókuszához közel helyezzük. Megjegyzendő, hogy prizma dőlése által előidézett hibát a prizma eltolása révén kompenzálni lehet.

Összességében láthatjuk, hogy a kívánt pontosság eléréséhez differenciál- vagy motorizált eltolók szükségesek. Emellett fontos megjegyezni hogy ezen küszöbszámokat kell teljesítenie az

alkalmazott forgatónak is, azaz a szinkron és aszinkron hibának kisebbnek kell lennie a fenti értékeknél. Ezért részletesebben megvizsgáltam a forgató hibáit.

Mindemellett figyelembe kell venni a nyaláb elmozdulását az objektív belépő apertúráján (továbbiakban: az objektíven). Homogén kivilágítás esetén ez akkor válik problémává, ha az elmozdulás olyan nagy, hogy az objektívet nem világítjuk ki teljesen, hiszen ekkor lényegében csökkentjük a numerikus apertúrát, és ezzel csökken a feloldás. Természetesen egy egyszerű és biztos megoldás, ha a kivilágító nyaláb mérete nagyobb az apertúránál. Az elmozdulás akkor jelent nagyobb problémát, ha fázismanipulációt alkalmazunk a kivilágításra (lásd 5.4 fejezet). Ekkor azt találjuk, hogy a nyaláb néhány $100\mu\text{m}$ elmozdulása is hibához vezet.

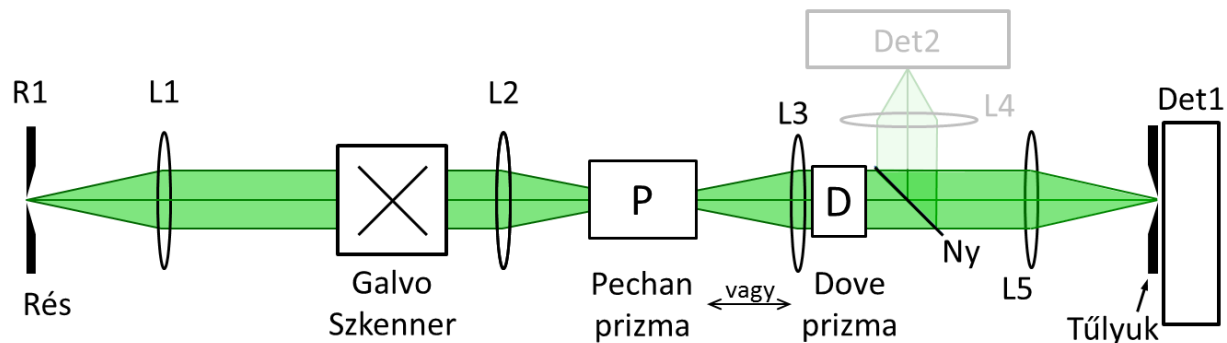
Az elmozdulás két okból következhet be: a L2-L3 teleszkóp és a képforgató prizma révén. Ideális esetben L2 és L3 közös fókuszú és L2 elülső fókuszában helyezkedik el a galvo tükör, és L3 hátsó fókuszában az objektív belépő apertúrája. Nem jelent problémát, ha a tükör a fókuszponton kívül esik, mindaddig, amíg az objektívet a konjugált síkba helyezzük. Tegyük fel, hogy a tükör a fókuszban van és az objektív távolsága a fókusztól $d=6\text{mm}$, ekkor egy $\pm 0,5^\circ$ pásztázási szögtartományt véve a két szélső helyzet között a nyaláb elmozdulása az objektíven $100\mu\text{m}$. Látható, hogy a kívánt pontosság elérése alapvetően nem jelenthet problémát. Ellenben körültekintőnek kell lennünk, amennyiben a vonal hosszához képest nagy az X hiba (36. oldal 5.1.1 fejezet), és emiatt egy a vonal hosszirányban korrigáló tükröt is be kell helyoznünk. Körültekintést igényel továbbá a Dove prizma alkalmazása L3 után. Ekkor ugyanis a prizma, φ elforgatási szögének függvényében a konjugált síkot eltolja axiális irányban. Például egy 10mm átmérőjű prizma esetén a konjugált sík pozíciója $\varphi=0^\circ$ és $\varphi=90^\circ$ esetén 10mm -re helyezkedik el egymástól. Akkor kapunk minimális hibát, ha a két pozíció közötti síkba helyezzük az objektívet. Ekkor egy $\pm 0,5^\circ$ pásztázáskor $\approx 60\mu\text{m}$ elmozdulást tapasztalunk.

A képforgató prizma L3 előtt elhelyezve akkor vezet be elmozdulást az objektíven, ha megdöntjük. Ha például $f_3=300\text{mm}$, és a prizma megdöntése $0,01$ fok, akkor L3 fókuszába helyezett objektíven a nyaláb elmozdulása $\approx 100\mu\text{m}$. Amennyiben a prizmat L3 mögött helyezzük el, akkor a prizma eltolása és megdöntése is eltolja a nyalábot az apertúrán, azaz a két hiba hatása összeadódik. Ebben az esetben a kidöntésből származó hiba értelemszerűen kisebb, ha a prizma közelebb helyezkedik el az objektívhez. Továbbá a prizma és a teleszkóp által okozott hiba értelemszerűen összegződik.

5.1.3. Kísérleti elrendezés és mérések

Az alábbiakban egy LSTOM rendszer főbb elemeit tartalmazó, sematikus elrendezést fogok bemutatni. Továbbá ismertetem, hogyan lehet az optikai tengely elmozdulását jellemző limacon görbét, és az Y függvényt megmérni. Három forgatóegységet fogok a beállíthatóság, stabilitás és aszinkron hiba tekintetében vizsgálni.

A lézerforrás ($\lambda=532\text{nm}$) nyalábját átfókuszáljuk egy hengerlencsével R1 résen (16. ábra). A rés felől érkező nyalábot L1 lencse kollimálja. L2 és L3 teleszkóp nagyítástól függően $M=1,3-3$ -nak választottuk. Ahogy a fentiekben említettük, a mintára fókuszált vonal és a pásztázási irány forgatása L3 lencse előtt és után is megvalósítható. Az alábbiakban mindkettő esetre látunk majd példát. A forgatáshoz Pechan és Dove prizmát egyaránt használtunk. A Dove prizma előnye, hogy transzmissziója $\approx 90\%$, míg a Pechan prizmáé 65% , ami fluoreszcens módban kritikus. A Dove prizma azonban csak L3 mögé helyezhető, mert az L3 előtti pozícióban, átfókuszáláskor nem kívánt asztigmatizmust vezet be a prizma [80]. Geometria



16. ábra: LSTOM sematikus elrendezés, Y hibafüggvény mérése

szempontból L3 előtti pozíció kedvezőbb, hiszen ott lényegesen több hely áll rendelkezésre ($f_2+f_3 \gg f_3$). Az elhelyezhetőség különösen akkor kritikus szempont, ha a forgató mérete nagy, és ha több eltoló és döntő elem kerül beépítésre. Három elrendezésből származó tapasztalataimat fogom a következőkben összefoglalni:

Az első esetben egy egyedi készítésű forgatóegységet alkalmaztunk. A cél az volt, hogy a prizma optikai tengelyét, a forgató tengelyét és az optikai tengelyt a lehető legtokéletebben egymáshoz igazítsuk, ezért elláttuk a forgatót és a prizmát 2-2 eltolóval és 2-2 döntőelemmel. A méretviszonyok megkövetelték, hogy a forgató L3 elé kerüljön, ezért Pechan prizmát használtunk. A második esetben egy kompakt (Thorlabs PRM1/MZ8E) forgatóra helyeztem a Pechan prizmát, és helyeztem L3 elé, míg a harmadik esetben ugyanehhez a forgatóhoz egy Dove

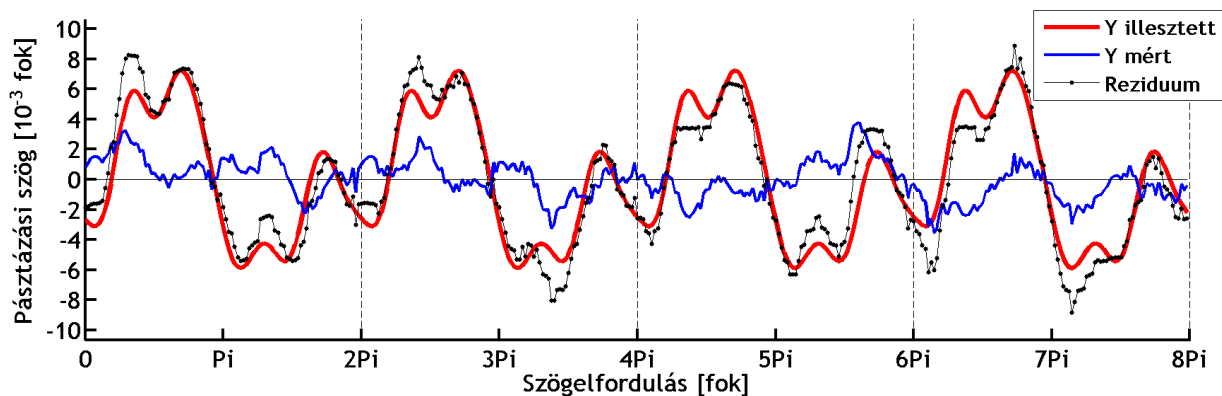
prizmát rögzítettem és helyeztem L3 lencse mögé. Az egyes megoldások tulajdonságainak ismertetése előtt tekintsük át, hogyan mérhető és értékelhető ki a Y hibafüggvény.

Hibafüggvény mérése

Az x. fejezetben láthattuk, hogy a nem ideális adatgyűjtés esetén, a tükrök középállása (ϑ_0) mellett a pásztázó vonal C_0 helyett Y -nal eltolva C_i ponton helyezkedik el. Y távolság megmérhető, ha a C_0 pontba egy tűlyukat és mögé egy detektort helyezünk el. Amikor C_i körül felveszünk egy projekciót, a detektált fény intenzitása maximális lesz, amikor a vonal közepe a tűlyukon tartózkodik. A maximális értékhez tartozó galvo pozíció (ϑ_i) és a középállás (ϑ_0) különbsége arányos Y hibafüggvénnyel paraxiális közelítésben. Az alábbiakban a mért Y_m függvényt a teleszkóp nagyítását figyelembe véve, az objektív előtt adjuk meg, hogy összehasonlíthatóak legyenek a paraméterek a három rendszer esetén. Az alábbiakban a mért Y_m függvényt fogjuk a prizma és a forgató pontosabb beállítására felhasználni.

1.rendszer – pontos beállítás

Tekintsünk elsőként azt az elrendezést, amelynél az L2 és L3 lencse közé helyezünk egy Pechan prizmát, amely egy egyedi készítésű forgatóra van rögzítve. A forgatót és a prizmát elláttuk a szükséges szabadsági fokokkal, hogy lehetséges legyen a tengelyeik tökéletes ráállítása az optikai tengelyre. A beállítás történhet úgy, hogy a prizmától néhány centiméterre, és tőle több méteres távolságban elhelyezett ernyőn vizsgáljuk a nyaláb pozícióját eltérő forgató állásoknál, és ez alapján korrigáljuk a forgató és a prizma tengelyeit. Azt tapasztaltuk, hogy ezt a beállítást alkalmazva az Y_m hibafüggvény amplitúdója tipikusan néhány $0,01^\circ$ fok nagyságú. Az OSLO modellre alapozva pontosabb beállítást dolgoztam ki. A mért Y_m függvény illesztéséből származó paramétereket felhasználva következtethetünk ugyanis arra, hogy mely tengelyek igényelnek korrekciót. Mivel a döntés és az eltolás mértékét pontosan nem adja meg az illesztés, ezért néhány Y_m rögzítéséből és ezt követő korrekcióból álló ciklus szükséges, de a módszer segítségével elértem, hogy az A_1 és A_2 paraméterek rendre $0,0048^\circ$ illetve $0,0034^\circ$ értékre csökkenjen. Azaz közel egy nagyságrenddel jobb beállítást sikerült elérnem, mint az ernyőt alkalmazó beállítással. A további optimalizálást azonban a forgató hibája limitálta. A 17. ábrán látható egy mérés eredménye, mely során a 4 egymást követő körben $3,75$ fokonként felvettük Y függvény értékét. A mért adatsoron egyértelműen látszik, hogy magasabb harmonikusok is jelen vannak, továbbá, hogy körülfordulásonként az Y függvény értékei jelentősen változnak, azaz jelentős az aszinkron hiba. Az illesztéshez a modellfüggvényt kibővítettük 5 felharmonikussal,



17. ábra: Y hibafüggvény alakja a prizma 4 körülfordulására

hogy jobb illeszkedést kapjunk. Azaz a mért és az illesztett függvény különbsége közel véletlenszerűnek mondható.

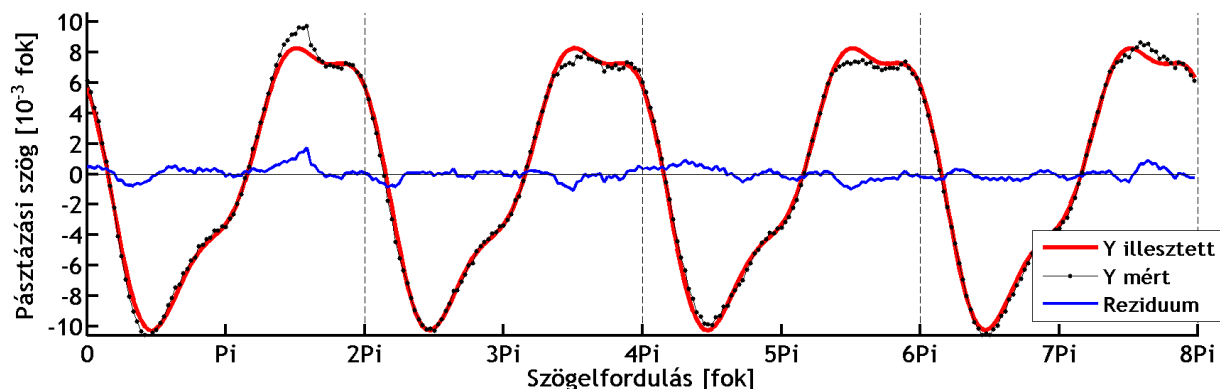
A 3.-7. felharmonikusok amplitúdója ekkor rendre: $[7; 18; 7; 7; 1] \cdot 10^{-4}$ foknak adódik. Látható, hogy a 4. számottevő. Ezen felül az aszinkron hiba négyzetes szórása 0.0013° .

Tehát elmondható, hogy valóban jól beállítható a prizma a módszerrel, amíg el nem érjük az aszinkron hiba nagyságrendjét. Kisebb szinkron és aszinkron hibával rendelkező forgató esetén feltehetőleg pontosabb beállítás lett volna elérhető. Ezen beállítással a korábban meghatározott $1,5-8 \cdot 10^{-4}$ fokos kritikus szögtartományt nem érjük el. Fontos továbbá, hogy a beállíthatóságnak komoly ára van, ugyanis a forgatóegység geometriai kiterjedése, és az eltoló és döntő elemek miatt az optikai tengelyt függőlegesre kellett építeni, ami nagyon megnehezítette a rendszer hosszú távú stabilitásának biztosítását, és nehezen szerelhetővé teszi a rendszert.

2.rendszer - kompromisszumok

A második ismertetésre kerülő elrendezés abban tér el az előzőtől, hogy egy kompaktabb DC motoros forgatót (Thorlabs PRM1/MZ8E) használtam a forgatás megvalósítására. Mivel a forgató kevésbé terhelhető, ezért a prizma nem szerelhető eltoló és döntő egységre, így a kézíleg elérhető pontosságot nem haladhatja meg a beállítás. Beállítás után a prizma fixálásra került, ami viszont a hosszútávú stabilitásra volt kedvező hatással. A forgató eltolóval finoman tolható (ez számít L3 előtt), kézi pontossággal dönthető. A prizma L2 és L3 közé került behelyezésre. Az optikai tengely ebben az esetben vízszintes és összességében stabilabbnak mondható az elrendezés.

Ebben az esetben az átlagos beállítás mellett A_1 és A_2 paraméterek nagysága tipikusan $0,05^\circ$ és $0,02^\circ$, míg az Y -on alapuló precízebb beállítással $0,0089^\circ$ és $0,0013^\circ$ érhető el. Az 18. ábrán látható ezen beállítás mellett mért Y_m függvény. A felvételhez a prizmat négyszer egymás után 10 fokként forgattam körbe.



18. ábra: Y hibafüggvény alakja a prizma 4 körülfordulására

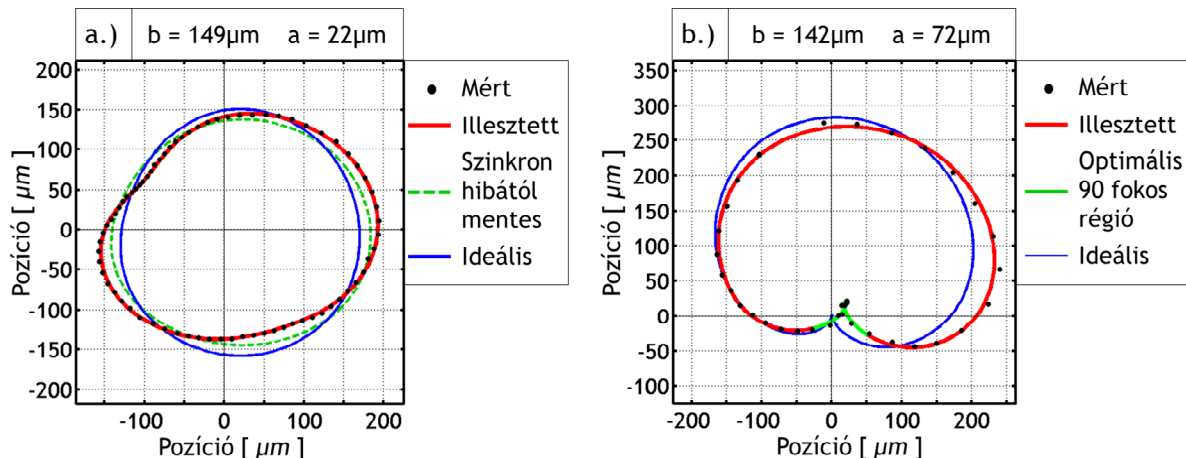
Látható, és az illesztés alapján megerősíthető, hogy kevesebb a felharmonikus, amelyek 3-7. rendre: $[16; 1; 1; 1; 0] \cdot 10^{-4}$ fok. Látható, hogy a 3. tag igen domináns. Az illesztett és mért görbe különbsége alapján az aszinkron hiba négyzetes szórása 0,0007 foknak adódik, viszont több $\approx 0,0015$ fok nagyságú eltérés is megfigyelhető. Megmértük emellett a nyaláb mozgását a fókuszáló objektív belépő apertúráján, és azt találtuk, hogy két szélső helyzet közötti eltérés 800 μ m, ami nem felel meg a későbbi alkalmazások kritériumainak. A problémát az alábbi elrendezés kapcsán elemezzük részletesebben.

3.rendszer – objektív kivilágításának optimalizálása

A harmadik rendszerben a fluoreszcens üzemmód miatt Dove prizmát alkalmaztam a kedvezőbb transzmissziója miatt. A Dove prizma az L3 lencse mögött helyezkedik el. Ezen rendszer esetében alkalmaztam egy később ismertetésre kerülő fázismanipulációs módszert, amely megköveteli, hogy pontosan középen világítsuk ki az objektívet. Tehát nem elég önmagában az Y függvény mérése, hanem fel kell vennünk az optikai tengely által az objektív belépő apertúrájának síkjában leírt limacont. A méréshez a rendszer elején L1 lencse után behelyeztem egy íriszt úgy, hogy annak közepe pontosan a kollimált nyaláb közepével essen egybe. Ekkor az írisz beszűkítésével, egy nagyon keskeny nyaláb halad közvetlenül az optikai tengely mentén. Ha beteszünk egy CCD kamerát az objektív belépő apertúrájának síkjába, rögzítünk egy-egy képet a prizma $[\varphi_1, \dots, \varphi_N]$ szögállásainál, meghatározzuk a kapott képeken a folt középpontját, akkor megkapjuk a kérdéses görbe Descartes-i koordinátáit. Ebben az esetben x és y irányonként illesztünk f modellfüggvénnyel, ahol az első két tag együttthatói a limacon paraméterei (a, b) , és a magasabb rendű tagok a korábbiakhoz hasonlóan a szinkron hibát veszik számításba. A mért paraméterek ebben az esetben is felhasználhatóak a tengelyek beállításához, és a sorfejtést az $N=7$ tagig tekintjük.

Ezen rendszerben különösen fontos a stabilitás, ezért a Dove prizma pozíciója a forgatóhoz képest teljesen fix, tengelyének állását a rögzítésére használt gyűrű és a forgató foglalatának esztergálási pontossága határozza meg. Emellett a forgató is teljesen rögzített, ellenben az optikai tengely állítható egy tükörpárral.

Az 19. ábrán látható két mért görbe, amelyeket azon Descartes koordináta-rendszerben ábrázoltam, amelynek origója egybeesik a limaconok polár koordináta rendszerben vett origójával. Az apertúrán való elmozdulást mikronban adtam meg, a fekete pontok a mért pontokat, a piros görbék az illesztett görbéket ábrázolják. A görbék rögzítésén és illesztésén alapuló beállítással az optikai tengely dőlésszögét minimalizáltam a forgatóegység tengelyéhez képest. Az a paraméter minimális értéke $22\mu\text{m}$ volt, miközben a rögzített prizma tengely miatt a b paraméter értéke állandó, átlagosan $145\mu\text{m}$. Ezen a, b paraméterpár mellett a kapott görbének jó közelítéssel egy körnek kellene lennie, ehelyett, ahogy azt a 19.a ábrán láthatjuk a mért görbe jelentősen eltér a körtől. A korábbi (5.5) modellfüggvénnyel azonban igen jól illeszthető a mért görbe. Ha az illesztési paramétereket tekintjük, azt találjuk, hogy a 3. felharmonikus amplitúdója jelentős ($17\mu\text{m}$). Ha a felharmonikusok, azaz szinkron hiba nélkül ábrázoljuk az illesztett koordinátákat, akkor egy elliptikus görbét kapunk. Ennek az az oka, hogy b értéke eltér az x és az y illesztés esetén, mégpedig $b_x=160\mu\text{m}$ és $b_y=130\mu\text{m}$. Ez azzal magyarázható, hogy a forgó rész tengelye kissé más irányba mutat a két, egymásra merőleges irányban, és emiatt a prizma a forgás során az egyik irányban jobban megdől, mint a rá merőleges irányban. Ha a két irányban kapott b paramétert átlagoljuk, akkor megkapjuk az ideális limacon, ami $a \neq 0$ miatt kis mértékben eltér a körtől. A 19.b ábra esetén is a szinkron hibától mentes, átlagolt b paraméterrel ábrázolt limacon



19. ábra: kivilágító nyaláb elmozdulása az objektív belépő apertúráján két, eltérő beállítás mellett

értjük ideális alatt. A hibák hatására a görbe aszimmetrikussá válik, kimozdul az origóból és enyhén elfordul. A görbe sajátossága, hogy a hibáktól függetlenül rendelkezik egy befűződéssel. Ehhez az optikai tengelyt úgy kell beállítani, hogy az a paraméter közelítőleg fele legyen b értékének (kardoid [79]). Ekkor létezik olyan 90 fokos szögtartomány (zöld ív), amelyen belül a mért pontok pozíciójának átlagos négyzetes eltérése $17\mu\text{m}$, továbbá egy $80\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ tartományon belül tartózkodnak. Ez esetünkben igen hasznos, hiszen a prizma tengelye nem állítható (így b értéke konstans $144\mu\text{m}$), de megfelelő paraméterválasztással elérhető, hogy az optikai tengely minimálisan mozogjon az objektív belépő apertúráján. A méréseknél ezt a beállítást használtam a megfelelő szögtartományban.

A CCD-n mért elmozdulás a korábban tárgyaltak szerint a prizma eltolásából és megdöntéséből egyaránt származhatnak. A két mennyiség szétválasztható, ha a prizma mögött egy további helyen rögzítjük a limacont, vagy ha az objektív helyére egy lencsét helyezünk, és annak fókuszában rögzítjük C_i pontokat. Utóbbi megoldás előnye, hogy a lencse mögött a prizma eltolásának nincs hatása C_i pozíciójára. Ez alapján azt találtuk, hogy a prizma és az optikai tengely dőlése lévén bevezetett hibát jellemző paraméterek: $A_1=0,092^\circ$ és $A_2=0,014^\circ$. A két síkban kapott paraméterek a CCD-s módszer hibahatárán belül megegyeznek, ami arra utal, hogy a hiba szinte teljesen a kidöntésből származik. Az eltolás mértéke legfeljebb $5\mu\text{m}$. Több körülfordulás koordinátáit illesztve a felharmonikusok amplitúdója $[11,1.7,1.5,0.4,0.2]*10^{-3}$ fok, továbbá az aszinkron hiba a mérési pontosság határa alatt van.

A fentiek alapján elmondható, hogy az optikai tengely döntése révén jó beállítás érhető el, amelyet azonban limitál a prizma rögzítési pontossága. Az a paraméter jó hangolhatósága miatt beállítható egy görbe, amely esetén a nekünk szükséges tartományban minimális az optikai tengely eltérése. Két síkot vizsgálva azt találjuk, hogy a kidöntés a kritikus.

A három elrendezésnél kapott eredményeket vetettem össze az alábbi 2. táblázatban. A Pechan prizma L3 lencse előtt, a Dove prizma L3 mögött helyezkedett el. A biztosított szabadsági fokok száma, és azok állíthatóságának precizitása látható a 3-4. sorban. Emlékeztetőül megemlíthető, hogy A_1 paraméter kapcsolódik a prizma beállításához, míg A_2 a forgatóéhoz. A szinkron hiba nagyságát úgy számoltam, hogy a 3-7. felharmónikusokat fázishelyesen összegeztem, a maximális és minimális érték alapján számolt amplitúdót vettem. Érdeemes megfigyelni, hogy bár a 2. és 3. típus esetén ugyanazt a forgatót alkalmaztuk, az aszinkron hibára 3. esetén egy nagyságrenddel rosszabb értéket kaptunk. Emellett a beállítási paraméterek is egy

Elrendezés		1.	2.	3.
Prizma		Pechan	Pechan	Dove
Szabadsági fok	Prizma	4 precíz	2 kézi	fix
	Forgató	4 precíz	2precíz, 2 kézi	2 kézi
Optikai tengely		fix	fix	4 precíz
Beállíthatóság pontossága	A_1 (10^{-3} fok)	4.8	8.9	92
	A_2 (10^{-3} fok)	3.4	1.3	14
Forgató hibája	Szinkron (10^{-3} fok)	2.7	1.8	15
	Aszinkron (10^{-3} fok)	1.3	0.7	≈ 0.9
Stabilitás		problémás	jó	jobb

2. Táblázat: LSTOM elrendezések beállítási adatai

nagyságrenddel rosszabbak. A harmadik esetben a két síkban elvégzett vizsgálat alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a paraméterek (a módszer hibahatárán belül) megegyeznek a prizma megdöntésével. Feltehetőleg hasonló pontosság volt elérhető 2. esetben is, de különösen valószínű, hogy az aszinkron hiba mértéke hasonló volt. A kapott paraméterek attól kicsik, mert a prizma közel volt L3 fókuszához, és ezért a szögeltérésből származó hiba minimális volt. Tehát a teleszkópon belüli elhelyezés e tekintetben szerencsésebb. Ha viszont az objektíven való elmozdulást is figyelembe kell venni, akkor L3 utáni pozíció kedvezőbb.

5.1.4. Konklúziók

Ebben a fejezetben ismertettem, hogy milyen hatást gyakorol a prizma az optikai tengelyre. Szimulációkkal vizsgáltam, hogy a tengely eltérítése milyen hatással van a képalkotásra, és a feloldásra. A feloldás romlása alapján kijelöltem egy hibahatárt, majd elméleti és kísérleti úton vizsgáltam, hogy ez milyen mértékben valósítható meg egy pásztázó rendszerben. Azt találtam, hogy a kívánt beállítási pontosság megközelíthető, ha a prizmat a teleszkópon belül helyezzük el.

5.2 LSTOM asztigmia segítségével előállított pásztázó vonallal

Amint azt az 5.1. fejezetben láthattuk, a vonal képforgató prizmával történő forgatása körülményes és potenciális hibaforrásokat rejt, hiszen a prizma beállításában vétett kis pontatlanság és a forgató hibái jelentős mértékben befolyásolják a szinogram rögzítését, hibákat eredményezve a rekonstrukcióban. Az alábbiakban áttekintjük, hogy milyen alapvető, általánosnak mondható megoldások merülnek fel a hiba kompenzálására. Röviden vizsgálni fogjuk a kalibráció, és a szoftveres korrekció alkalmazhatóságát LSTOM rendszerben, majd egyedi megoldásokat is ismertetek a prizma által bevezetett hiba kiküszöbölésére.

5.2.1. Optikai tengely eltéréslésének korrigálása

LSTOM rendszerben is használhatóak szoftveres korrekciók, de figyelembe kell vennünk azt, hogyha a prizma révén eltolt C_i pontban vesszük fel a projekciót, akkor a projekció egy adott (Y hibafüggvény amplitúdójával arányos) részét a látómezőn kívül rögzítettük, illetve a látómező egy adott részéről nem gyűjtöttünk információt az adott φ prizmaállás mellett. Ezért a szoftveres utókorrekció után egy szűkebb tartományról kapunk képet. Ez egy, az előző fejezetben tipikusnak mondott beállítás mellett azt is jelentheti, hogy akkora a hiba, hogy nem tudunk képet rekonstruálni belőle. Tipikus veszteséget nehéz mondani, mert az nyilván függ az aktuális hibától, az alkalmazott $\varphi=[\varphi_0, \dots, \varphi_0+90^\circ]$ szögtartománytól, a kép méretétől, a lépésköztől. Természetesen rögzíthető hosszabb projekció, de az a mérési idő növelésével jár. Az Y hibafüggvény illesztésén alapuló beállítással viszont a beállítás hibája egy nagyságrenddel csökken, ami azt jelenti, hogy a szoftveres korrekciókor a veszteség lényegesen kevesebb. Példaként véve az 5.1 fejezet 1. típusú elrendezésével, alapos beállítás mellett mért Y hibafüggvényt, a hiba maximális értéke ± 25 lépésköz körüli. Figyelembe véve a méréskor használatos lépésköz nagyságát, ez a hiba ± 10 -15 pixelnek felel meg, ami például egy 512x512 pixeles képnél elhanyagolható lehet. A szoftveres korrekció során tapasztaltuk azonban, hogy a szinogram általában nem korrigálható tökéletesen ($R/10$ pontossággal), mert a képtorzulások nagyobb része megszűnik bár, de kép maradandó feloldáscsökkenést szenvedhet.

Másik lehetőségként kínálkozik az előzetes kalibráció. Ez úgy valósítható meg LSTOM rendszerben, hogy előzetesen rögzítjük a korábban ismertetett Y hibafüggvényt és a kapott paramétereket felhasználjuk egy későbbi mérésnél. Ekkor paraméterek alapján tetszőleges φ prizmaállás mellett megmondható, hogy mely $\vartheta_{max}(\varphi)$ galvo tükör állás mellett helyezkedik el a vonal az ideális C_0 pont felett, azaz ezen pozíció körül kell rögzíteni a projekciókat

$[\vartheta_{\max,y} - M \cdot \Delta\vartheta, \vartheta_{\max,y} - (M-1) \cdot \Delta\vartheta, \dots, \vartheta_{\max,y} + M \cdot \Delta\vartheta]$. Értelemszerűen a kalibráció

használhatósága korlátozott a forgató aszinkron hibája révén, amely véletlenszerűen módosítja az optikai tengely aktuális irányát a korábban megmért irányhoz képest. Mivel az aszinkron hiba nagysága általában nagyobb $R/10$ határnál (2. táblázat), ezért használata csak utólagos szoftveres korrekcióval kiegészítve alkalmazható. Mint említettük, a szoftveres korrekciók esetén fennáll azonban, hogy csak egy bizonyos pontossággal tudják helyreállítani a projekciók helyét, ezért limitáltan alkalmazhatóak.

A kalibráció sikeresen alkalmazható azonban a C_0C_i vektor vonalirányú komponense, azaz az X hiba esetén (5.1.1 fejezet). Ezen komponens hatása a hosszirányú eltolás, akkor kritikus, ha a látómező mérete összemérhető az eltolással. Ez egy kevésbé jó beállítás és rövid vonal esetén lép fel, amilyen az 5.1 szerinti 2. elrendezés volt például. A hiba minimalizálható ilyen esetben, ha X -et megmérjük, és kalibrációként használjuk a felvétel során. Ezt adaptáltam, és sikeresen használtam. Ehhez szükséges egy második galvo tükör, amely a nyalábot a vonal hosszirányában dönti meg. Ekkor az X függvényt szintén megmérhető egy túlyuk segítségével: több φ prizmaállás mellett a vonal csúcspontját keresztirányban a túlyukra pozicionáljuk, majd a vonalat hosszirányban végigtoljuk a túlyukon. Megmérve az átjövő intenzitást, a kapott profilból meghatározható a vonal közepe. Az illetett X függvény paraméterei használhatóak fel későbbi méréseknél hosszirányú korrekcióra. Mivel a hosszirányú korrekció esetén az aszinkron hiba által bevezetett eltolás elhanyagolható.

Egy további lehetőség, hogy a mintán olyan markereket helyezünk el, amik jól felismerhetőek a szinogramon, és azok alapján igazítjuk a képet. Erre alkalmasak lehetnek például nanorészecskék. A markerek alkalmazhatósága több szempontból limitált. Egyrészt nem mindig helyezhető el a mintán, vagy például biológiai mintára nézve toxikusak lehetnek. Másrészt a fényességüket nem lehet tetszőlegesen megválasztani, előfordulhat, hogy túl erősen világítanak, és túlzottan elnyomják a fluoreszcencia jelét. A marker tagadhatatlan előnye azonban, hogy információt szolgáltat arról, hogyha hőmérsékleti vagy mechanikai driftek következtében a minta elmozdul valamilyen irányban. Ez különösen nagy numerikus apertúra mellett érdekes, hiszen ott a feloldás 178nm ($NA_{1,49}$, $\lambda=532\text{nm}$, $k=0,5$), azaz a mintát 18nm pontosan a helyén kell tartani. A projekciók drift miatti elmozdulásának szoftveres korrekciója hasonlóképpen lehet opció marker nélküli esetben is, de az említett limitációval.

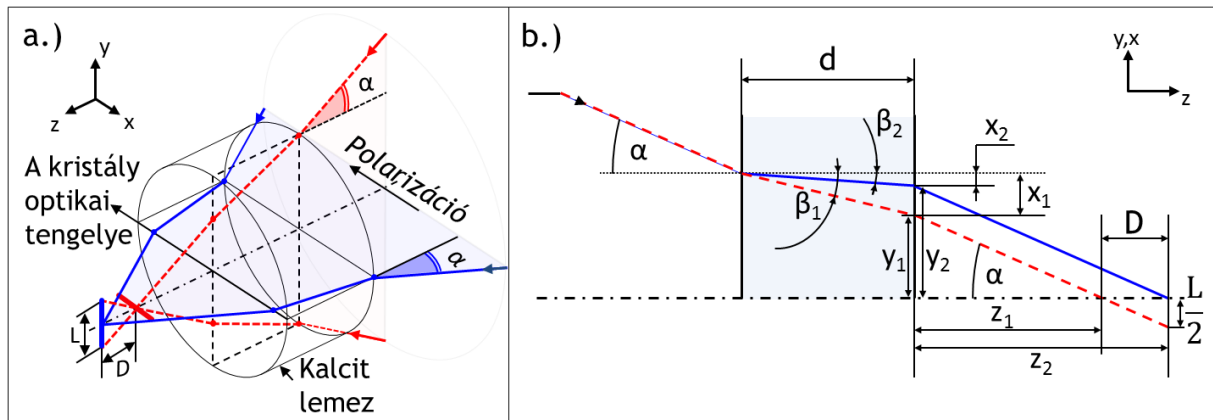
Egy egyedi, kifinomult megoldás az Y függvény in-situ mérésén alapszik. Ha a túlyukat a minta (egy nyalábosztóval létrehozott) konjugált síkjába helyezzük el, akkor a szinogram rögzítés során, adott prizmaállás mellett meghatározhatjuk az aktuális $\vartheta_{max}(\varphi)$ tükröpozíciót, és az körül rögzíthetjük a projekciót a mintáról. Ezáltal elimináljuk az aszinkron hiba hatását. Ekkor lényegében a túlyuk kijelöl egy virtuális forgási középpontot a mintán, aminek ekkor nem is kell feltétlenül pontosan egybeesnie az ideális C_0 ponttal. A kísérleti módszert kidolgozta és részletesen ismertette doktori dolgozatában Gajdáty Gábor [69, E1]. A módszert a későbbi LSTOM rendszerekben is alkalmaztuk, azon módosítással, hogy a projekciókat a mintával szimultán vesszük fel a túlyukról, amivel jelentős mérési idő takarítható meg. A túlyukról szimultán rögzített szinogram alapján korrigáljuk utólagosan a mintáról felvett szinogramot. Hogy egy φ mellett rögzített projekciónak minimális része vesszen el a korrekció során, a projekciókat $\vartheta_{max}(\varphi-1)$ pozíciók körül rögzítem. Az in-situ korrekció természetesen X irányban is alkalmazható, de időigénye miatt a kalibrációs korrekció célravezetőbb. Az in-situ korrekció egy stabil megbízható megoldás, de néhány nem kívánt gyakorlati következménnyel jár. Egy konjugált síkot kell létrehozni a prizmat követően, tehát fényt kell kicsatolnunk a fókuszáló objektív felé tartó nyalábból. Ez fluoreszcens vizsgálatoknál azt jelenti, hogy a gerjesztő fény és a fluoreszcens fény egy részét elveszítjük. A veszteség csökkenthető, ha reflexiós bevonatot nem tartalmazó nyalábosztó hártáival a fény kisebb részét csatoljuk ki. Azonban a hártya együttesen a prizmával kedvezőtlenül befolyásolja a polarizációs viszonyokat. Továbbá minél nagyobb látómezőt alkalmazunk, annál kevesebb jut át a túlyukon, ami a növekvő zaj miatt kedvezőtlenül befolyásolja a korrekciót, így érzékenyebb detektor használatát követeli meg.

A képforgató prizmával szemben javasolt egy másik megoldást Gajdáty Gábor és Erdélyi Miklós. A módszer lényege, hogy p-típusú kalcit lemezen, megfelelő polaritású nyalábot átfókuszálva asztigmia révén egy diffrakciólimitált vonal hozható létre, amely kivilágításul szolgálhat egy LSTOM rendszernek. A módszer előnye, hogy a polarizáció és a kalcit lemez forgatásával a vonal hibamentesen és stabilan forgatható, mivel a forgatott optikai elemek eltolásra invariánsak, ezáltal a forgató hibái nem befolyásolják a vonal forgatását, illetve az elemek nem igényelnek olyan pontos geometriai beállítást, mint egy képforgató prizma. A vonal létrehozásának mechanizmusát és a potenciális hibaforrásokat Sinkó József részletesen vizsgálta OSLO program segítségével. Az asztigmiaán alapuló LSTOM (aLSTOM) kísérleti megvalósítása, és ehhez kapcsolódó vizsgálatok képezik a saját tudományos eredményem.

5.2.2. Asztigmia vonal létrehozásának elméleti áttekintése

Adott egy egytengelyű optikai kristályból, esetünkben kalcitból készült d vastagságú lemez, amelynél az optikai tengely párhuzamos a polírozott felülettel. Helyezzük a kristályt egy polarizálatlan konvergens gömbhullám útjába. Ha a polarizáció iránya merőleges az optikai tengelyre (ordinárius nyalábmenet), és ha a szférikus aberráció elhanyagolható, akkor a lemez mögött a fázisfront továbbra is egy gömbhullám, és a fókuszban egy szabályos Airy folt jön létre. Ha a polarizáció iránya egybeesik az optikai tengellyel, akkor a törést követően a fázisfront elliptikussá válik (a törésmutató anizotrópiája miatt, 2.4 fejezet), és a fókuszban asztigmia figyelhető meg. A következőkben ez utóbbi extraordinárius esetet tárgyaljuk. A geometriát az 20.a ábrán láthatjuk.

A kalcit lemezen fókuszáljunk át egy $NA=\sin\alpha$ numerikus apertúrájú lencsével. Az összetartó nyaláb lineárisan poláros úgy, hogy a polarizáció síkjába esik az optikai tengely. Két kitüntetett irányban tekintsük a nyaláb menetét: a kristály optikai tengelyére merőleges (zy: 1) és azzal párhuzamos (zx: 2) irányban. Ekkor 532nm hullámhossz esetén a korábbiak szerint az 1.



20. ábra: (a) asztigmia létrejötte kalcit kristály esetén. (b) vonalhossz és asztigmias távolság meghatározása.

irányban a törésmutató megegyezik az extraordinárius törésmutatóval $n_1=1,488$, míg a 2. irányban az elliptikus fázisfront miatt ettől eltérő $n_2=1,85$ törésmutatóval írható le a törés. Az eltérő törésmutatók miatt a két irányban a lemez mögött eltérő távolságban jön létre a fókusz, azaz asztigmia lép fel, melynek mértéke jól jellemezhető az asztigmias távolsággal (D). Az asztigmias távolságból az asztigmias vonalak hossza (L) számolható ($\sin\alpha=L/2D$). Az 20.b ábra közös síkban ábrázolja az 1. és 2. síkban, az apertúra szélén, α szög alatt, érkező nyalábok törését. Az alább látható, 5.7 és 5.8 egyenletek felhasználásával kiszámolható D asztigmias távolság.

$$\sin \alpha = n_i \cdot \sin \beta_i \quad D = z_2 - z_1 \quad (5.7 \text{ a,b})$$

$$z_i = y_i \cdot \operatorname{ctg} \alpha \quad x_i = d \cdot \operatorname{tg} \beta_i \quad (5.8 \text{ a,b})$$

$$D = \operatorname{ctg} \alpha \cdot (y_2 - y_1) = \operatorname{ctg} \alpha \cdot (x_2 - x_1) \quad (5.9)$$

$$D = d \cdot \operatorname{ctg} \alpha \cdot (\operatorname{tg} \beta_2 - \operatorname{tg} \beta_1) \quad (5.10)$$

$$D = d \cdot \cos \alpha \cdot \left((n_1^2 - \sin^2 \alpha)^{-2} - (n_2^2 - \sin^2 \alpha)^{-2} \right) \quad (5.11)$$

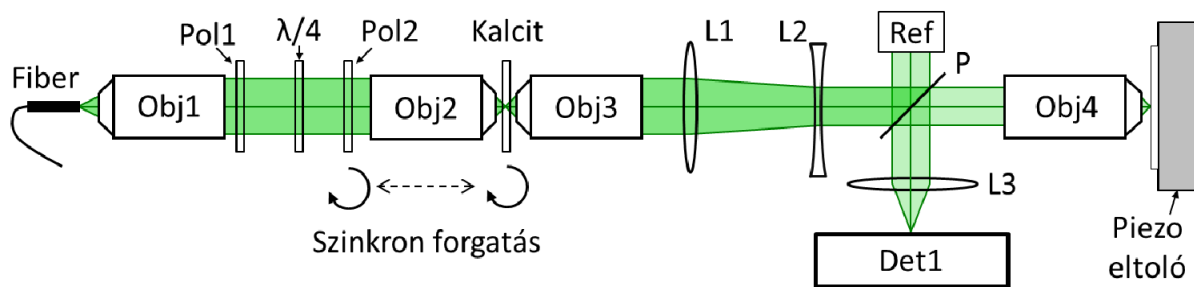
5.7 a) egyenlet írja le a törést az első felületen, míg a többi három a geometriára vonatkozik. Írjuk be 5.7 b) egyenletbe 5.8 a)-t, és használjuk ki, hogy $y_1 - y_2 = x_1 - x_2$. Írjuk be 5.9-be 5.8 b)-t majd a kapott 5.10 összefüggésbe 5.7 a)-t. Egyszerű trigonometrikus átalakításokkal adódik 5.11. Mivel ekkora numerikus apertúránál $\sin^2 \alpha$ egy nagyságrenddel kisebb n_i^2 -nél, ezért D és ezzel L közelítőleg arányos n_1 és n_2 törésmutatók különbségével, továbbá arányos a lemez vastagságával (d) és $\cos \alpha$ tagon keresztül függ a fókuszáló lencse numerikus apertúrájától (NA). Kísérletben alkalmazott 0,45-es numerikus apertúrájú objektív, és 0,5mm vastag kalcit lemez esetén $D=65\mu\text{m}$ -t ad a formula, ami alapján a vonal $66\mu\text{m}$ hosszúnak adódik, ami jó egyezésben van a mért adatokkal ($L \approx 60\mu\text{m}$, $D=70\mu\text{m}$). Mivel ez a vonalhossz elegendő nagyságú látómezőt biztosít, ezért egy kalcit kristállyal a leírt módon bevezetett asztigmia megfelelő lehet egy LSTOM mikroszkóp megvilágításához.

A tomográfiás adatgyűjtés megvalósításához szükség van a vonal forgatására, és ebben rejlik ezen kivilágítás előnye, hiszen, ha a kalcit lemezt (és vele a polarizációs síkot) elforgatjuk, akkor az asztigmias vonal is elfordul, és emellett, mivel a kristály eltolásra invariáns, ezért a képforgató prizmákkal ellentétben az eltolásra nézve nem igényel különösebb beállítást. Ismeretes azonban, hogy ha megdöntünk egy planparalel lemezt, akkor az eltolja a nyalábot. A fenti példát tekintve (M20x, NA0.45, $d=0.5\text{mm}$) ez azt jelenti, hogy 20.a ábra szerinti yz vagy xz síkban $0,02^\circ$ -kal megdöntve a kalcit lemezt, a vonal elmozdulása 57nm , azaz $\approx R/10$. További számolásokban ellenőriztük, hogy a megdöntött lemez nem vezet-e be aberrációkat, és azt találtuk, hogy $0,1^\circ$ vagy annál kisebb beállítási pontosság mellett nem áll fenn ennek veszélye. A kalcit lemezzel a polarizáció síkját néhány fok pontossággal együtt kell forgatni, hogy biztosítsuk, hogy csak az extraordinárius módus gerjesztődjön, különben az ordinárius nyaláb fénye zajjal terheli a mérést.

5.2.3. Asztigmias LSTOM kísérleti megvalósítása

A fenti módszer kísérleti megvalósíthatóságát fogjuk a következőkben diszkutálni. Gyakorlati szempontból kérdéses a fenti geometria megvalósíthatósága, ugyanis növekvő numerikus apertúrával az objektívek munkatávolsága csökken, ezért nem helyezhető el az objektív és a minta közé tetszőleges vastagságú lemez. Ez a probléma részben megkerülhető azzal, ha a nyalábot a kalcit lemez után kollimáljuk, majd újra lefókuszáljuk egy immár tetszőleges numerikus apertúrájú objektívvel. Ekkor lemezen való átfókuszálásra kisebb munkatávolságú, azaz nagyobb numerikus apertúrájú objektívet használhatunk, amivel (5.11) szerint hosszabb vonalat tudunk létrehozni. Limitáló tényező továbbá, hogy nagy numerikus apertúra esetén a planparalel lemezen történő átfókuszáláskor szférikus aberráció lép fel, ezért az objektívnek rendelkeznie kell fedőlemez-korrekciónal. Az alkalmazható korrekció maximális mértéke objektívenként változó, de tipikusan a felső határa 1,2-2mm, ezért ennél vastagabb lemezt nem alkalmazhatunk.

A forgatásnál a lemez rögzíthetősége merül fel kérdésként, illetve olyan forgató szükséges, amelynek két oldalán elfér az átfókuszáló és a kollimáló objektív. Továbbá fontos, hogy mindig csak az extraordinárius módust gerjesszük, ezért a kalcit lemez irányát és a polarizációs síkot egymáshoz kell igazítani és szinkronban kell forgatni. Ehhez két precíz forgatóra van szükség. Tekintsük át az alábbiakban az asztigmias LSTOM (aLSTOM) konkrét kísérleti megvalósítását (21. ábra):



21. ábra: asztigmias LSTOM kísérleti elrendezése

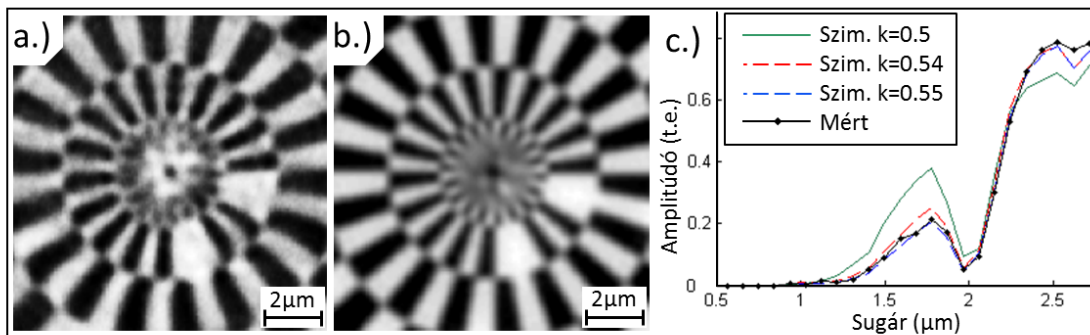
Egy egymódusú optikai szál segítségével végeztem térszűrést a lézernyalábon. A szálból kilépő fényt Obj1 mikroszkóp objektív (Olympus, M4x/NA0,1) segítségével kollimáltam. Mivel a lézerforrás fénye elliptikusan poláros; ezért azt, hogy a későbbiekben a Pol2 polarizátor forgatása mellett a mintát kivilágító vonal intenzitása ne változzon, egy polarizátorral (Pol1) és egy $\lambda/4$ -es lemezzel cirkulárisan polárossá tettem. Az Obj2 (Zeiss Neofluar, M20x/NA0,4) és

Obj3 (Olympus, M20x/NA0,4) mikroszkóp objektív pár valósítja meg a 0,5 mm vastag p típusú kalcit kristályon való átfókuszálást. A két objektív konfokális elrendezésben van az egyik asztigmias vonalra nézve. Az Obj2 objektív megfelelően nagy munkatávolsággal bír (7mm), így a lemez és annak rögzítése is megfelelően elfér a két objektív között, továbbá változtatható fedőlemez-korrektóval rendelkezik. A megfelelően kollimált nyalábot L1 és L2 lencsepár átméretezi, hogy a fókuszáló Obj4 objektív (Nikon CFI LU Plan EPI ELWD, M50x/NA0,55) belépő apertúráján minimális legyen a fényvesztés. A minta pásztázását piezóval valósítjuk meg úgy, hogy a vonalra merőleges irányban adott lépésközzel mozgatjuk a mintát. Utóbbi megtehető, mert lépési pontosság (5nm) két nagyságrenddel kisebb, mint a feloldás (480nm). A mintáról reflektált fény 45%-át a P pellicle továbbítja Det1 Si fotodetektor felé.

A polarizátor (P2) Obj1 és Obj2 objektívek között helyezkedik el, és egy léptető motor forgatja, melynek minimális lépésköze 0,225 fok. A kalcit lemezt egy Thorlabs PRM1Z8 típusú DC motoros forgató forgatja, melynek legkisebb reprodukálható lépésköze 0,03 fok, ezért együtt tud lépni a léptető motorral. A mérések előtt kalibrálás végeztem: a polarizációs síkot hozzáigazítottam az optikai tengely irányához. Az ordinárius nyaláb tökéletes kioltásának beállításakor az jelent nehézséget, hogy intenzitása jóval kisebb lesz, mint az extraordinárius nyalábé, továbbá az, hogy Obj3 mögött a két nyaláb majdnem teljes fedésben van. A beállításhoz Obj2 fokális régióját felnagyítva Obj3 segítségével az extraordinárius nyaláb egy vonalat, míg az ordinárius egy körlapot alkot, és ez által a kioltás jól beállítható.

Feloldás meghatározása

Az aLSTOM rendszert először egyszerű litográfiai mintákon, majd a képalkotását és feloldását a Richardson csillag segítségével vizsgáltam. A projekciókat 0,9 fokonként vettem fel 180°-os tartományban, irányonként 90nm-es lépésközzel pásztázva végig a mintán. Az 22.a ábrán látható a csillag mért rekonstruált képe. A rekonstruált kép alapján elmondható, hogy a mért kép izotróp, és a torzulások nem számottevőek. A méréssel azonos paraméterekkel szimulált felvételt készítettem (5.1-ben leírtakhoz hasonlóan) a csillagról, ideális $k=0,5$ paramétert feltételezve. Az ideális rekonstruált kép látható 22.b ábrán. Ezután csillagról több számolt kép készült növekvő k paraméterek mellett. A mért és számolt képeket az MTF módszerrel kiértékeltem és összevetettem őket. A kapott görbéket 22.c ábrán tüntettem fel, a számoltak közül a hibamenteset és a mérthez legközelebb eső két számoltat ábrázolva. Az összehasonlítás alapján a mért csillag esetén a k paraméter 0,55-nek adódik.

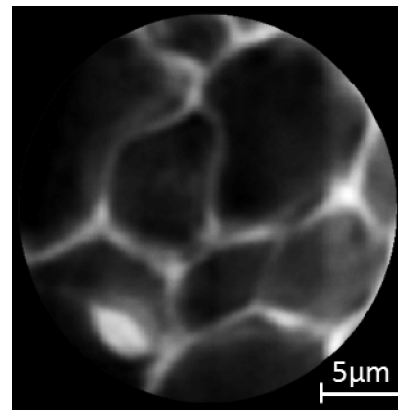


22. ábra: (a) aLSTOM mikroszkóppal felvett Richardson csillag és (b) számolt megfelelője.
(c) feloldás meghatározása a modulációs függvény vizsgálatával.

Az így becsült k érték jócskán elmarad az elméleti értéktől, aminek több oka is lehet. Az egyik hibaforrás a szférikus aberráció, amely a fedőlemez-korrekciónak ellenére terhelhette a kivilágító vonalat. Felmerül továbbá a kérdés, hogy az eltérő törésmutatók mellett beszélhetünk-e megfelelő mértékű fedőlemez-korrekciónak. A korrekció során ugyanis bizonyos lencsetagokat elmozdítva korrigálunk egy d vastagságú BK7 ($n_{532}=1,519$) lemez által bevezetett hibára. De esetünkben eltér a törésmutató az optikai tengely irányában és arra merőlegesen: $n_1=1,488$, $n_2=1,85$. A két törésmutató közötti eltérés gondot okozhat, ugyanis közöttük az optikai útkülönbség $OPD=(n_2-n_1) \cdot 0,5\text{mm}=0,181\text{mm}$. Ami összemérhető egy BK7 fedőlemezben ($d_2=0,16\text{mm}$) haladó nyaláb optikai úthosszával ($d_2 \cdot n_{532}=0,24\text{mm}$). Egy fedőlemezre viszont tipikusan 0,4-es numerikus apertúra esetén már korrigálni szükséges. Ez jelentheti azt, hogy alapesetben nem hajtható végre tökéletes korrekció. Beállításkor ezért különböző fedőlemez korrekció értékek mellett rögzítettük LSF-et és minimalizáltuk az ebből származó hibát. A második hibaforrás az O2, O3 objektívek konfokálitása, ami nehezen beállítható az asztigmia miatt. LSF mérésen alapuló beállítást hajtottunk végre ezért ebben az esetben is. A két hiba együttesen, az illesztések alapján, az LSF kiszélesedése révén 1-2% hibát okozhat. A legnagyobb hibaforrás azonban feltehetőleg a piezo tömb hiszterézise. Ugyanis míg a piezo egy adott pozíciót nagyon pontosan fel tud venni, addig a projekciók rögzítéséhez szükséges, aránylag gyors pásztázás esetén azt tapasztaltuk, hogy pontatlanul veszi fel a pozíciókat, ami hiszterézis jellegű hibát okoz. Erre a hibára utólagos szoftveres korrekciót alkalmaztunk, de a projekciók tökéletes újrapozicionálását nem érthettük el. Lehetséges lett volna a pontosságot lassabb pásztázás révén növelni, de ekkor viszont a megnövekedett mérési idő miatt a hőmérsékleti driftek okoznak észrevehető mértékű eltolást a projekciókon. Megoldást jelenthet, ha a rendszerben galvo tükröket használunk pásztázásra, de akkor a rendszert teleszkopikus

lencsepárokkal szükséges kiegészíteni. Ez ront a rendszer kompaktságán, és esetlegesen más hibaforrásokat idéz elő.

Bár később kerülnek tárgyalásra a fluoreszcens mérések, de röviden előrebocsátható az aLSTOM rendszer fluoreszcens módban történő alkalmazása. A megfelelő dikroikus nyalábosztó, emisszós szűrő, illetve fotoelektron-sokszorozó (PMT) beépítésével készítettem felvételeket *Convallaria Majlalis* mintáról. A rendszer előnye, hogy alacsony benne a fényveszteség (kevés optikai elem, nincs rés), hátránya viszont, hogy nem tehető konfokálissá triviális módon. A konfokáltság hiánya a jól látható a felvételen (23. ábra): a kép kontrasztja igen rossz, mivel elmosódottan megjelenik a nem fokális régiókból származó információ (2.3 fejezet).



23. ábra: aLSTOM mikroszkóppal készült fluoreszcens felvétel

5.2.4. Konklúziók

aLSTOM rendszerben tehát izotróp képeket tudtunk létrehozni reflexiós üzemmódban, ahol egy jó alternatíva egy képforgató prizmat alkalmazó LSTOM rendszerrel szemben. A kísérleti megvalósításnál a pásztázás és a szférikus aberráció jelent további kihívásokat. A kivilágítási és forgatási módszer fluoreszcens módban is alkalmazható a megfelelő nyalábosztó és filterek alkalmazásával, de legfőbb hátránya e tekintetben, hogy a konfokális detektálás nem valósítható meg triviális módon. Mivel a konfokáltság elengedhetetlen a biológiai alkalmazásokban, és mert a tervezett fókuszvonal-manipulációk sem valósíthatóak meg ezen kivilágítás esetén, ezért a későbbiekben képforgató prizmákat fogunk alkalmazni kiegészítve az in-situ korrekcióval. Megjegyzendő, hogy a módszer egy lehetséges alternatíva vonal előállítására rögzített lemez esetén is.

5.3 LSTOM adaptálása biológiai alkalmazásokhoz

Mivel a mikroszkópok egyik legfontosabb alkalmazási területe a biológia és az orvostudomány, ezért fontos, hogy a tomográfias optikai mikroszkóp is alkalmas legyen fluoreszcens minták vizsgálatára. Ehhez szükséges az optikai szeletelési tulajdonság, esetünkben a konfokális detektálás megvalósítása. Megvizsgáljuk továbbá, hogy hogyan optimalizálható a mikroszkóp fluoreszcens mérésekre, és hogy az alkalmazott módosítások milyen hatással vannak a rendszerre.

5.3.1. Konfokális, fluoreszcens LSTOM építése

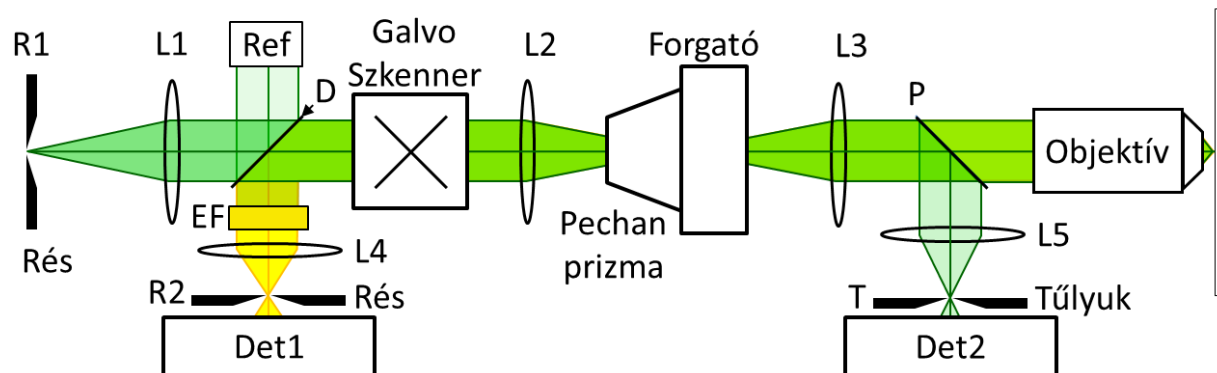
LSTOM rendszerben úgy valósítható meg a konfokálitás, hogy a galvo tükrök előtt elhelyezünk egy nyalábosztó elemet, és a mintáról érkező fényt kicsatolva átfókuszáljuk egy résen. A nyalábosztó elem reflexiós módban egy Pellicle és a későbbi szakaszban tárgyalandó fluoreszcens mód esetében egy dikroikus tükör. A vonallal pásztázó mikroszkóphoz képest az a lényeges különbség, hogy nem vonaldetektor helyezkedik el a konfokális síkban, hanem a résen átjutó fényintenzitás összegzésre kerül. Ez jelentősen megnehezíti a konfokális kar beállítását. Igen kritikus a rés dőlésszöge, különösen nagy látószög, azaz hosszú vonal esetén. Egyszerű becslés tehető a megkívánt beállítási pontosságra átlagosnak tekinthető paraméterek mellett. A pásztázó mikroszkópiában helyes mintavételezésnek tekinthető (well sampling) $R/3$ lépésköz esetén, egy nagyobb 1024×1024 kép felvételéhez $341 \cdot R$ hosszú vonal szükséges. Ha 1 Airy egység széles rést tekintünk, akkor is legalább $R/2$ beállítási pontosság szükséges a vonal teljes hossza mentén. Ami azt jelenti, hogy közelítőleg $0,05$ fok pontosan be kell állítani a rést. Egy másik tervezési szempont a konfokális kar méretezése (24.ábra). Konfokálitás szempontjából ekvivalens ugyanis, ha adott méretű apertúra mellett adott fókusz távolságú lencsét ($L4$) N -szer nagyobb fókusz távolságúra választunk, miközben a rést ($R2$) is N -szer szélesebbnek választjuk (amíg a paraxiális közelítés érvényes). Ezért például a kompakt (kis fókusz távolságú) konfokális kar korláta, hogy tetszőlegesen keskeny, jó minőségű rés nem elérhető. A fix szélességű rések előnye, hogy igen jó minőségűek, ezért a későbbiekben ilyeneket alkalmazunk az LSTOM elrendezésekben. A demonstrációs célokat szolgáló vonalpásztázó rendszerek esetén CCD-t használunk vonaldetektorként, nagy fókuszú lencsék ($f=1\text{m}$) fókuszában. Gyakorlati kivitelezéskor felmerülő fontos kritérium továbbá, hogy a kivilágító és detektor LSF pontosan legyenek egymáshoz képest (laterálisan és axiálisan) centrálva, azaz a rést megfelelő pontossággal kell beállítanunk. A CCD ebben az esetben jelentős előnnyel bír.

Fluoreszcens mód és gyakorlati vonatkozásai

A fluoreszcens módra való áttérés első közelítésben egy technikai kérdés, de szükséges megvizsgálni, hogy melyek azok a tényezők, amelyeket az LSTOM rendszer esetén szem előtt kell tartani. Fluoreszcens mérésekhez lényegében az szükséges, hogy a fluoreszcens festék által emittált fényt hatásosan el tudjuk különíteni a gerjesztő fénytől úgy, hogy eközben minimális számú fotont veszítsünk, továbbá a kis intenzitások miatt érzékenyebb detektor alkalmazása szükséges. Emellett lényegében egy fotonszám-analízist kell végezni az LSTOM rendszerben,

hogy maximalizáljam a gerjesztést és a detektort elérő emittált fotonok számát. Ami általános szempontként elmondható, hogy az optikai elemek száma legyen minimális, és lehetőleg dielektrikum tükröket használjunk. A gerjesztés szempontjából fontos, hogy a fluoreszcens jel erőssége csak bizonyos mértékig fokozható a gerjesztő fény intenzitásának növelésével, addig, amíg az fakulást vagy fototoxicitást nem idéz elő a mintában. Ha adott fényteljesítmény áll rendelkezésre, akkor minél hosszabb pásztázó vonalat hozunk létre, annál kisebb fényteljesítmény jut a pásztázó vonal adott pontjába.

Az 24. ábrán látható egy konfokális, fluoreszcens LSTOM mikroszkóp kísérleti elrendezésének sematikus vázlatja. A lézerforrás fényét egy hengerlencse segítségével fókuszáljuk át résen. A széttartó nyalábot L1 lencse kollimálja. A pásztázást galvo tükrökkel, a forgatást egy pechan prizmával valósítottuk meg. L3 lencse mögötti nyalábosztó hártya a fény 8%-át kicsatolja. Az L5 lencse fókusz síkjában helyezkedik el egy tűlyuk, és mögötte egy Si-detektor, amellyel az in-situ korrekciót valósítjuk meg. A mintáról érkező emittált fényt a dikroikus nyalábosztó csatolja ki a konfokális karba. Tekintsük át, hogy ebben a rendszerben hogyan maximalizálható a detektort elérő fotonok száma.



24. ábra: fluoreszcens és konfokális LSTOM elrendezés

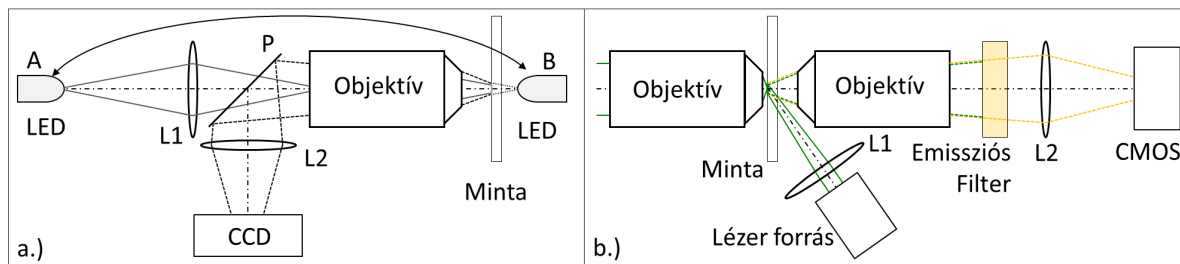
A minta felőli oldalon fontos, hogy minél nagyobb NA-jú objektívet használunk, annál nagyobb térszögben tudjuk begyűjteni az emittált fotonokat. Ha feltesszük például, hogy egy pontszerű emitter a teljes (4π szteradián) térszögben egyenletesen sugároz, akkor például NA1,49 objektív olajimmerzió esetén a fotonok 40%-át gyűjti össze, ellenben egy NA0,4 objektív csupán annak 4%-át. Olaj immerziós objektív esetén további előny, hogy nincs reflexiós veszteség az objektívbe lépéskor. Természetesen nagy NA esetén a gerjesztett térfogat sokkal kisebb, azaz, ha a minta túl ritkán van megfestve, akkor elég kevés fotont emittál. Az emittált fotonok számát természetesen befolyásolják a használt festék spektrális tulajdonságai, és kvantumhatásfoka.

Annak érdekében, hogy az emittált fotonok minél nagyobb hányadát detektáljuk a dikroikus nyalábosztót és az emissziós filtert alkalmasan kell megválasztanunk, továbbá lehetőleg széles rést kell alkalmaznunk a konfokális karban. Utóbbit méréseinknél 1 Airy egység szélesnek választottuk. Ezek mellett figyelembe kell venni, hogy kromatikus hiba léphet fel, ezért az L2, L3, L4 lencsákat érdemes akromátoknak választani.

A tomografikus adatgyűjtés megvalósításához szükséges optikai elemek rontják a fotonhozamot egy szokásos konfokális elrendezéshez képest, azaz a képforgató prizma és ehhez kapcsolódóan a in-situ korrekciós elrendezés, ezért ezeket érdemes röviden áttekinteni. A Pechan prizma használata előnyös, mert igen kompakt, például egy 20x20mm-es belépő apertúrához 20x23x35mm-es kiterjedés tartozik, továbbá be- és kilépő apertúrája merőleges az optikai tengelyére, és ezért könnyen rögzíthető egy kisebb forgató felületéhez. A kompaktságnak azonban ára van, ugyanis két, egymáshoz nem ragasztott darabból áll, emiatt 4 közeghatáron lép át a fény, továbbá emellett 3 visszaverődést szenved. A prizma oldalsó lapjain nincs viszont teljes reflexió, ezért reflexiós réteggel vonják be, amelyen jelentős veszteség lép fel. Összességében a Pechan prizma transzmissziója $\approx 65\%$, ami fluoreszcens módban nem tolerálható. A Dove prizma egyszerűbb felépítése révén egy lehetséges alternatíva, hiszen transzmissziója $\approx 90\%$. Geometriája viszont kedvezőtlenebb, mert 20x20mm belépő apertúra mellett 85mm hosszú. Szem előtt kell tartani továbbá, hogy a Dove prizma diszperzív elem, így a rajta áthaladó nyalábot a hullámhossz függvényében eltolja, ami szétkenheti a nyalábot a konfokális rés felett, további veszteséget okozva. Ezért ha L2 és L3 között helyezük el, akkor a rés méretével azonos (10 μ m) eltoláshoz vezet 18nm hullámhosszkülönbség 10mm Dove és M0,75 esetén a konfokális karban. Emellett átfókuszáláskor asztigmatizmust vezet be. A képforgató prizmák tükrös elrendezésekkel kiválthatóak, jobb transzmissziót biztosítva, és aberrációkat kiküszöbölve, azonban a sajátos geometriájuk miatt ezek szerelése, beállíthatósága, és az tükrök pontos relatív helyzetének garantálása nehezebb. Az alábbi demonstrációs jellegű méréseknél Pechan prizmát alkalmaztam, mert a beállíthatóság és stabilitás kapott prioritást (5.1 fejezet 1. rendszer).

Ezen felül fontos kitérni egy látszólag triviális problémára: a minta pozícionálására. Ez egyrészt azért fontos, mert összehasonlító méréseknél a mintán ugyanarról a résről szeretnénk képet csinálni LSTOM-ban, mint más mikroszkópokkal. Másfelől, mint arra később látunk példát, egy kiterjedt, strukturált mintában szeretnénk megtalálni bizonyos tartomány, bizonyos objektumokat. Ehhez a minta mozgatása nem jelent problémát: a tárgylemez mozgathatósága, az

eltolók és piezó kocka együttesen lefedik a centimétertől az 5nm-ig mérettartományt. A nehezebb kérdés visszajelzést kapni arról, hogy a minta mely része helyezkedik el az aktuális látómezőben. Más mikroszkópoknál lehetőség van arra, hogy akár a szemünk, akár egy CCD révén viszonylag nagy képfrissítési frekvenciával kapjunk képet a látómezőről. Ez problémás az LSTOM esetén,

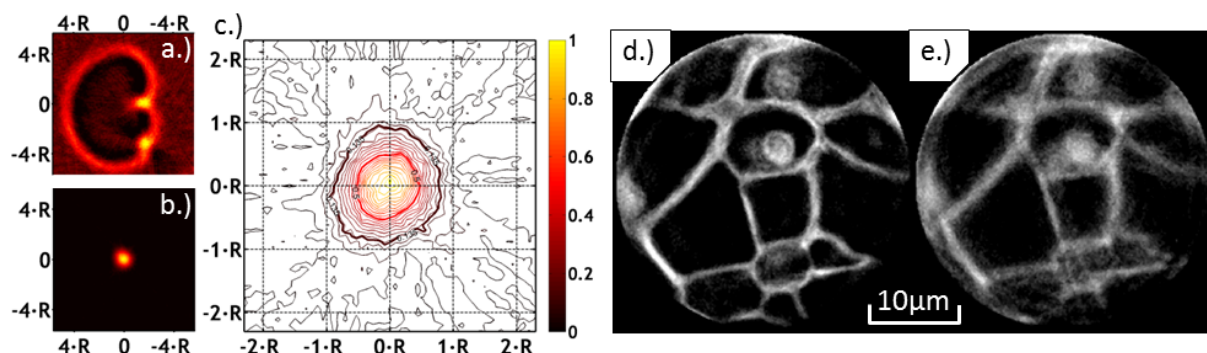


25. ábra: pozicionáló mikroszkóp elrendezés (e) transzmisszió, reflexió, és (b) fluoreszcens megvalósítása.

mert bár néhány alul-mintavételezett projekció felvehető a kellő gyorsasággal, de a kellő számú prjekció felvétele, és a prizma forgatása lassú, így rekonstruált képet nem kaphatunk kellő gyorsasággal. Lehetséges megoldás vonalpásztázó mikroszkópként használni a rendszert, egy vonaldetektor vagy CCD konfokális síkba történő helyezésével. Ez reflektív mintáknál egy megfelelő, könnyen megvalósítható megoldás lehet. Biológiai minták esetén a módszer reflexiós módban nem megfelelő a fellépő koherens szórás (speckle [44]) miatt, fluoreszcens módban pedig megfelelően érzékeny detektort igényel. Hagyományos mikroszkóppal könnyen kiegészíthető a rendszer, ha nincs geometriai akadály (25. ábra). Ehhez egy fehér LED fényével világítjuk ki a mintát vagy a vizsgáló objektív felől (A), vagy hátulról (B), és a mintát leképezzük egy CCD-re. „A” esetben P elem egy nyalábosztó hártya, „B” esetben pedig lehet egy billenthető tükör. Ez megkönnyíti a beállítást, különösen nagy numerikus apertúra használata esetén, de ha a minta egy kis régiójába kell navigálni, akkor az objektívek cseréje szükséges. Ennek pontos megvalósításához többállású revolverfejre (objective turret), vagy a mintatartó reprodukálható axiális irányú eltávolítására, majd visszatolására van szükség. A leírt mikroszkóp nem elégséges, ha a minta textúrájából nem derül ki, hogy a fluoreszcens festéssel ellátott objektumok a látómezőben vannak-e. Ezért praktikusnak találtuk az elrendezést egy fluoreszcens keresőmikroszkóppal kiegészíteni, lásd 25.b ábra. A mintát egy ferdén beeső lézernyalábbal világítjuk ki, a tárgylemez felőli oldalról, és vizsgáljuk egy Zeiss Neofluar M20x NA0,4 objektívvel. A fluoreszcens fényt egy 100mm fókuszú tubuslencse képezi a CMOS kamerára, ezzel a nagyítás 12x-es és a FOV 300 μ m. Ekkora numerikus apertúra mellett a kb 10 μ m objektumok jól kivehetőek, de kellőképpen nagy a látómező, hogy könnyen kereshessünk egy

hogy az LSTOM és Zeiss mikroszkópok esetén pontosan ugyanabban a mélységben rögzítsük a képeket. Megfigyelhető a képpárokon a szeletelési tulajdonság, hiszen fenti képek más síkról hordoznak információt, mint az alsó képek. Az utóbbi képek (g-j) képminőségében látható különbségek annak tudhatóak be, hogy utólag válogattam őket egymáshoz demonstrációs céllal, de nem ugyanazon alkalommal és így más mérési körülmények között készültek. g és j képek rövid mérések eredményei (pozíciókeresés), és emiatt a jel/zaj viszonyuk valamelyest rosszabbak.

A laterális feloldás és az izotrópia vizsgálatára $0,2\mu\text{m}$ átmérőjű, festett polisztirol gömbökről készítettem felvételt M20x/NA0,4 Zeiss Neofluar objektívet használva. Ekkora numerikus apertúra mellett a gömbök pontszerűnek tekinthetők ($R=0,665\mu\text{m}$, 4.1 fejezet). 360 fokos körülfordulás mellett vettem fel 2 fokonként projekciókat 58nm lépésközzel. Egyetlen



27. ábra: polisztirol gömbökről készült kép (b) in-situ korrekció alkalmazásával (a) és az nélkül. (c) izotrópia szemléltetése kontúr ábrán. Szinogram rögzítés (d) in-situ korrekció és (e) kalibráció alkalmazásával.

gömböt tekintve jól szemléltethető, mit eredményez a korrekció elhagyása (27.a ábra), ekkor egy limacont látunk kirajzolódni a képen. Az in-situ korrekció alkalmazása esetén egy szimmetrikus foltot kapunk (27.b). Az 27.c kontúr vonalas ábra alapján vizuálisan is ellenőrizhető az izotrópia. A feloldást vizsgálva azt találtuk, hogy a fluoreszcens LSTOM esetén jó egyezést kapunk az elméleti értékkel. Az alkalmazott 1AU résszélesség mellett nem várható a konfokalitásból származó javulás, ezért az elméleti feloldás $k=0,5$ mellett: $0,665\mu\text{m}$, míg az illesztés alapján a feloldás $0,67\mu\text{m}$ értéknek adódott.

A 27.d-e ábrapáron láthatóak Convallaria Majalisról készült felvételek. A baloldali képen látható egy az in-situ korrekció révén hibamentes felvétel. A rendszer transzmissziójának növelése kapcsán felmerült, a pellicle és ezzel az in-situ korrekció elhagyása. A jobboldali rekonstruált képen figyelhető meg, hogy kalibráció alkalmazása esetén mit eredményez az aszinkron hiba. A tapasztalt minőségromlás valóban nem tolerálható. A továbbiakban alkalmazni

fogom a korrekciót, illetve módszert javaslok arra, hogyan lehetséges a feloldás növelése, úgy, hogy a fluoreszcens fotonveszteség minimális legyen.

5.4 LSTOM fázismanipuláció

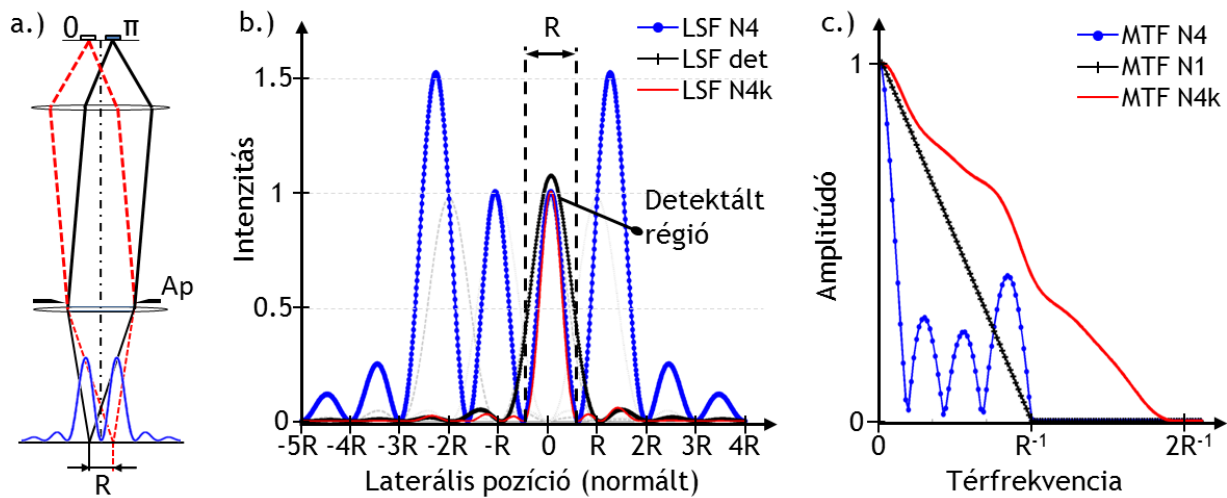
Az alábbiakban ismertetek két módszert, melyek révén a laterális feloldást növeljük meg a kivilágítás fázisviszonyainak módosítása révén. Az első módszer alapgondolata megközelíthető a strukturált kivilágítás felől, ahol egy fázisrács leképezésével érnek el feloldásjavulást. Ehhez hasonlóan a célunk a kivilágító részünket oly módon befolyásolni, hogy a mintára fókuszálva egy finomabb kivilágító struktúrát adjon. A manipulációt a tárgy illetve képsíkban hajtjuk végre, azaz pásztázó rendszerben tekintve: a fókuszban. A másik elgondolás során távoli zónában hajtjuk végre a módosításokat, azaz a lefókuszálásra kerülő nyalábot, avagy az apertúrafüggvényt manipuláljuk egy egyszerű fázismaszk használatával. A módszer hasonlít a ponttal pásztázó konfokális mikroszkóp esetén említett példákhoz. (2.1 fejr. anulárius apertúra, fázismaszk)

5.4.1. Fázismanipuláció megvalósítása fokális régióban

Adott d szélességű rést képezzünk le egy teleszkóp segítségével, ahol a nagyítást és a második lencse belépő apertúrájának méretét úgy választottuk meg, hogy a rendszer a résre nézve diffrakciólimitált legyen. Így egy sinc^2 eloszlás jön létre F fókuszban. Helyezzünk a réstől a távolságra laterális irányban egy másik d szélességű rést úgy, hogy a létrejövő sinc^2 eloszlás maximuma az előző eloszlás egyik 1. minimumhelyére essen. Ha a két résből érkező fény nem koherens, nem lép fel interferencia, és a két vonal összeolvad (akárcsak 7.ábra). Ha viszont a két résből induló fény koherens, és a második résben π fázistolást alkalmazunk, akkor a fókuszban a két csúcs között kioltást kapunk, azaz egy két csúcsból álló intenzitáseloszlást mérhetünk (28.a ábra). Ha N rést alkalmazunk váltakozó $0, \pi, 0, \pi, \dots$ fázistolással, akkor azt találjuk, hogy N növelésével egyre finomabb periódusú struktúra jelenik meg a fókuszban. $N \rightarrow \infty$ esetben a kivilágítás az ideális fázisrácsnak felel meg és a fókuszban egy R periódusú szinuszos rácsot kapunk. $N=2..5$ számú rést alkalmazva a fókuszban létrejövő struktúrák középső csúcsainak félértékszélessége rendre 65, 59, 55.5, 55 százalékkal kisebb, mint az egy rés által létrehozott, manipulálatlan sinc^2 eloszlás félértékszélessége, N további növelésével a középső csúcsok félértékszélessége már nem csökken tovább számottevően. A későbbiekben az $N=4$ darab fázismanipulált ($0, \pi, 0, \pi$ fázisú) rés révén keletkező, 4 csúcsot tartalmazó kivilágítást fogjuk vizsgálni, amelyre $N=4$ kivilágításként fogok hivatkozni. Ha $N=4$ kivilágítást alkalmazunk a hagyományos vonal-kivilágítás helyett, akkor annak ellenére, hogy finomabb részletet képezzünk

a mintára, pásztázáskor nem kapunk részletesebb információt a mintáról. Ez látható az 28.c ábrán ahol a hagyományos vonal-kivilágítás és az N4 kivilágítás átviteli függvénye látható.

Az általam javasolt megoldás a feloldásjavulás elérésére, hogy konfokális detektálással kombináljuk az N4 kivilágítást, amely révén csak az egyik központi csúcs által kivilágított térrészből detektálunk információt. Ez lényegében a konfokálitásnál tárgyalt z-beli szelektivitás laterális megfelelője. Ebben az esetben sem tudunk csak egy pontszerű régióból fényt gyűjteni, hiszen a detektálás diffrakció-limitált folyamat, amelyet a konfokális elméletben megismert



28. ábra: (a) két fázistolt vonal interferenciája, (b) N4 kivilágítás konfokális detektálással, (c) feloldásjavulás bemutatása frekvenciatérben.

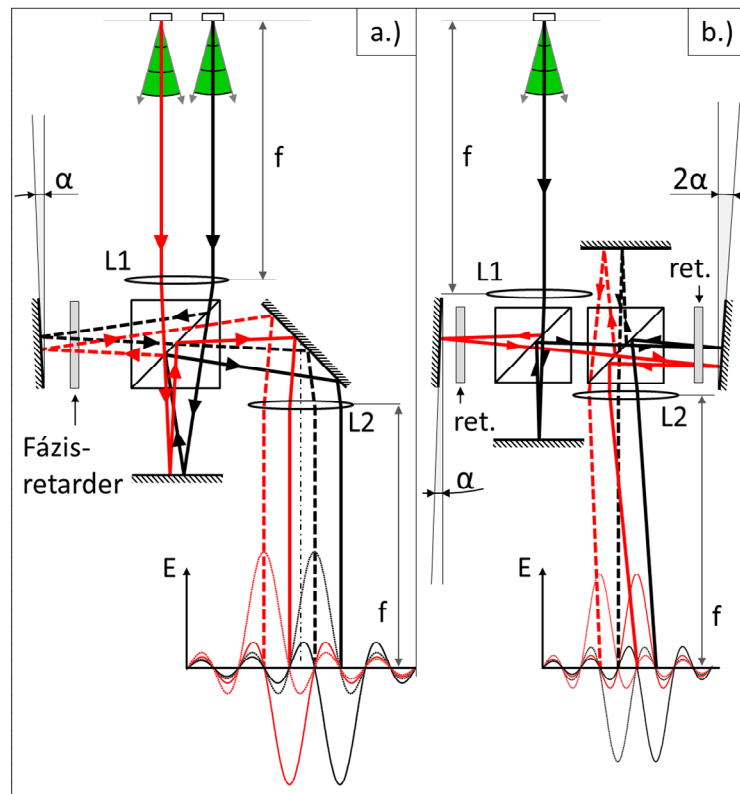
detektor LSF (49.o) bevezetésével írhatunk le. Az 28.b ábra ábrázolja az N4 kivilágítást és a detektor LSF által lefedett régiót. Az eredő LSF-et ($=LSF_{ill} \cdot (LSF_{det} \otimes D)$) jelöli a folytonos piros vonal, melynek félértékszélessége közelítőleg megegyezik a harmadik csúcsával. Az átviteli függvényen láthatjuk (28.c), hogy a konfokális detektálás alkalmazásával a levágási frekvenciáját közel kétszeresére toljuk ki.

A kivilágítás és a detektálás LSF-jének alakja és azok kölcsönös pozíciója határozza meg az eredő LSF alakját, és ez által a laterális feloldást, mellékmaximumok nagyságát, detektált fotonok számát. A konfokálitás esetén ismertetett modellt módosítva vizsgáltam, hogy milyen tényezők befolyásolják e paramétereket. Röviden elmondható, hogy a fókuszált vonalak távolságának csökkentésével a középső csúcsok intenzitása csökken a szélsőkhöz képest, míg ha távolítjuk őket egymáshoz képest, akkor a középső csúcsok intenzitása növekszik, de a feloldás csökken. Ha a vonalak közötti fázisok eltérnek egymástól, akkor a csúcsok intenzitása változik, például adódhat olyan eset, hogy a kivilágításnak szánt csúcs teljesen kioltásra kerül. Továbbá ha

a relatív fázisokban eltérés van, akkor nincs kioltás a tengelyen, és ez által romlik a feloldás, és erősödhetnek a mellékmaximumok. Szintén a mellékmaximumok növekedéséhez vezet, ha a konfokális rést nyitjuk, hiszen ekkor LSF_{det} kiszélesedik, és a szomszédos csúcsokból származó áthallás (cross-talk) egyre erősebbé válik, emellett a levágási frekvencia is csökken. Az LSF_{det} kiszélesedését okozhatják aberrációk is. A rés pozicionálása is nagyon fontos, mert a detektor LSF -nek igen pontosan egybe kell esnie a kiválasztott kivilágító csúcs által megvilágított régióval laterális és axiális irányban egyaránt.

Kísérleti megvalósítás

Az N4 kivilágítást interferometrikusan valósítottam meg. Ha egy $4f$ elrendezést, először fókuszában elhelyezünk egy rést, és a két lencse között egy Michelson interferométert, akkor az interferométer nyalábosztó eleme két részre bontja a beérkező nyalábot, ezzel létrehozva az $L2$ lencse fókuszában két, azonos intenzitású koherens vonalat (azaz a vonalat duplikálja). Megfelelő résszélesség esetén a létrejövő vonal diffrakciólimitált. Az interferométer egyik tükrének α megdöntésével eltolható a fókuszban a vonal, továbbá az



29. ábra: N4 kivilágítás megvalósítása (a) kettős rés és egy interferométer, (b) egy rés és két interferométer alkalmazásával.

egyik karban retardert alkalmazva a megfelelő π fázisolás is bevezethető. A kidöntött tükröt tartalmazó karban haladó nyalábot tekintjük a másik nyaláb másolatának. Ha két rést helyezünk el $L1$ előfókuszában (29.a ábra), olyan távolságban, hogy távolságuk az $L2$ fókuszában $2R$ legyen, továbbá α -t úgy állítjuk be, hogy a másolt és az eredeti csúcsok közötti távolság R legyen, valamint a retarderrel bevezetjük a szükséges π fázistolást, akkor a fókuszban létrejön az N4 eloszlás. Az ábrán az egyes sinc térerősség-eloszlások láthatóak interferencia nélkül. Ezzel

ekvivalens eredményt szolgáltató megoldás, ha egy rést helyezünk L1 fókuszába és kétszeri másolással állítjuk elő a négy vonalat (29.b ábra), úgy hogy a második interferométerben kétszer akkora kidöntést alkalmazunk, mint az elsőben. Ekkor két redarder segítségével állítható be a vonalak közötti $[0, \pi, 0, \pi]$ relatív fáziskülönbség. A kétféle kivilágítás bármelyike alkalmazható a korábban ismertetett LSTOM elrendezésben. Kísérletileg vizsgáltam az első módszert, de a kettős rés kivilágítása valamelyest körülményesnek bizonyult, továbbá nehéz volt teljesíteni azt a feltételt, hogy a kettős rés leképezve pontosan a feloldási limiten legyen, azaz a leképezett vonalak távolsága éppen $2R$ legyen. A kettős Michelson esetén pontosan hangolható a vonalak távolsága, de a több szabadsági fok, több stabilitási gondot is okozott.

Az alábbi kísérletek megvalósításához a kettős Michelson interferométert alkalmaztam. Tekintsük át, hogy milyen következményekkel jár ez az LSTOM rendszer esetén. Biztosítani kell a megfelelő beállítási pontosságot a tükör döntésének és a fázis hangolásának tekintetében, továbbá pontosan mérhetővé kell tenni ezeket a paramétereket. Egyik lehetőség a döntés és fázis visszamérésére az in-situ korrekciós kar, ahol túlyuk segítségével megmérhető LSF. Ha az interferométer egyes karjait felváltva kitakarjuk, akkor mérhetőek a duplikált csúcsok pozíciói, és ha páronként kitakarjuk őket, akkor a relatív fázis határozható meg. Ez a többszöri pásztázás miatt időigényes folyamat, de a kellő pontosság elérhető vele. Legjobb esetben is a tükrök beállítása 5-10percet, a fázis beállítása 4 percet vesz igénybe. Egy másik lehetőség, ha az interferométerek után egy CCD-vel rögzített interferogramból kiszámoljuk a kívánt paramétereket. Ez a megoldás megfelelő kalibrálást követően, egy gyors ellenőrzést tesz lehetővé a döntésre és fázisra nézve egyaránt. Mivel két megdöntött síkhullám interferogramját könnyű kiértékelni, ezért az interferométerek egy-egy karját kell felváltva kitakarni egy-egy shutterrel, amelyek sebessége limitálja az ellenőrzéshez szükséges időt. Ha eltérést tapasztalunk a fázisban, az a retarderek segítségével korrigálható, de a tükrök döntését manuálisan kellett végeznem. A fáziskorrekcióhoz szükséges teljes időtartam ekkor 10 másodperc volt.

A fázisok stabilitását vizsgáltam a hőmérséklet függvényében. Azt találtam, hogy a klimatizált laboratórium átlaghőmérséklete állandónak tekinthető, de a hűtési folyamat révén 10-15 perc periódusidővel változik a hőmérséklet $\pm 0,3^\circ\text{C}$ -ot, ami közelítőleg $\pm \pi/25$ fázisingadozást idéz elő. A tükrök többnyire néhány óráig megtartották kívánt pozíciójukat. Elhangolódásuk azonban értelemszerűen fázisváltozást is von maga után. A mechanikai hatások is befolyásolták a stabilitást: a rendelkezésre álló asztal nem garantálta az interferometrikus stabilitást. A

mechanikai stabilitás növelése érdekében egy kompakt elrendezést terveztem, optikai ketrec használatával. Összességében elmondható, hogy az interferometrikus módszer csak a néhány perces igénylő demonstrációs mérések esetén megfelelő.

Emellett tekintsük végig röviden, hogy milyen hatása van az optikai rendszerre a kettős Michelson interferométer alkalmazásának. A két interferométerben jelentős a fényút hossza, a fényvesztés (93%), és a nyalábosztó kockák nem kívánatos reflexiók sorát vezetik be, továbbá megdöntésük kis mértékben, de elforgathatja a nyalábot. Mivel egyes objektívek nagyítás és feloldás viszonya eltér, ezért ahhoz, hogy a duplikált vonalak távolsága a fókuszban R legyen, eltérő objektívek esetén eltérő α dőlésszög bevezetése szükséges, azaz az objektív cseréje esetén az interferométereket át kell hangolni. Emellett az N4 kivilágítás esetén az objektívet négy, egymáshoz képest megdöntött síkhullám világítja ki. A döntött fázisfrontok miatt a nyalábok közötti fáziskülönbség az objektív belépő apertúrájának közepén értelmezhető. Ez azt jelenti, hogyha két objektív (minta és in-situ kar) nincs centrálva, akkor a két fókuszban eltérő fázissal adódnak össze a nyalábok, ami probléma, ha az egyik fókuszban (in-situ kar) mérve az LSF-et akarjuk beállítani a fáziskülönbséget. Hasonló problémát okoz, ha objektív csere miatt változik az apertúra közepe, vagy ha a képforgató prizma révén elmozdul a négy nyaláb az objektívhez képest.

Emlékeztetőül megemlítendő továbbá, hogy az elméleti részben ecsetelvek miatt az eredő LSF érzékeny a detektor LSF pozíciójára és félértékszélességére, ezért pontosabb és stabilabb beállítás szükséges a konfokális karban (x, y, z, θ), továbbá minimálisnak kell lenniük a szférikus és kromatikus aberrációknak.

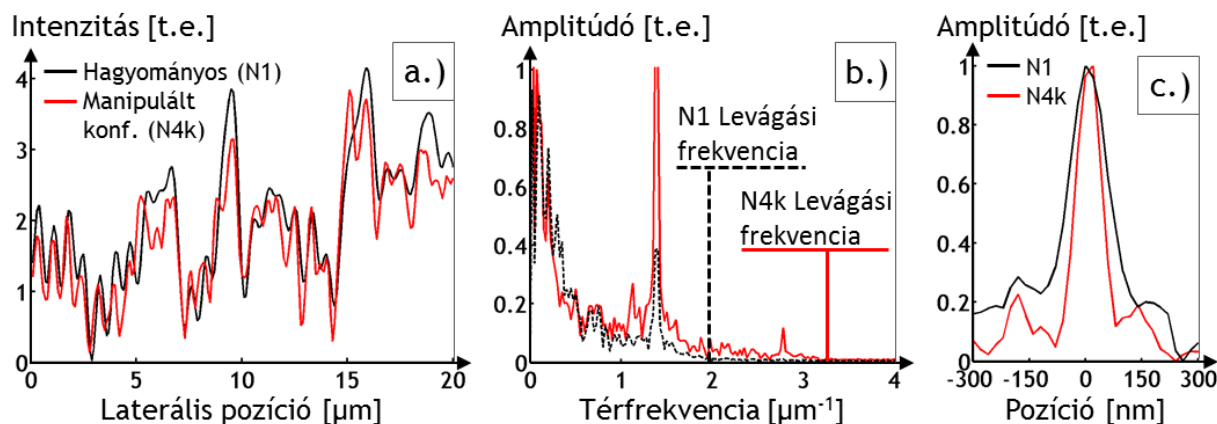
Mérési eredmények

Egy kettős Michelson interferométert építve a konfokális LSTOM-ba végeztem méréseket. CD nyomólemezeről rögzítettem projekciót M50x/NA0,55, Nikon CFI LU Plan EPI ELWD objektívvel, 0,1 μm lépésközzel. Az 30.a ábrán látható, hogy a projekción finomabb részletek figyelhetőek meg, ha N4 kivilágítás és konfokális detektálás kombinációját alkalmazzuk (N4k), mint hagyományos vonal kivilágítás esetén (N1).

Ez látható a több projekció Fourier transzformáltjából számolt MTF alapján is (30.b), hiszen N4k kivilágítás esetén a frekvenciaküszöb a kitolódik a nagyobb frekvenciák irányába. Az MTF levágási frekvenciája alapján számolt Rayleigh-féle feloldási küszöb: $481 \pm 15 \text{ nm}$ és

$315 \pm 15 \text{ nm}$ az N1 és N4k esetre, míg az elvi feloldási határ 483 nm . A feloldási jellemző paraméterek $k=0,51$ és $k=0,33$ értékeknek adódnak.

Felvételeket készítettem egy ezüst nanorészecskéket tartalmazó mintáról. Ebben az esetben projekciók helyett teljes vonalszkeneket készítettem, amihez a konfokális rés helyett egy CCD-t alkalmaztam. A felvételhez Nikon M100x/1,49NA immerziós objektívet használtam. A pásztázás lépésköze ebben az esetben 25 nm volt. A felvételeken különálló részecskéket keresve kiolvastam az LSF-et, és illesztettem azokat. Egy ilyen felvétel páros látható 30.c ábrán. Látható, hogy N4c esetén határozottan keskenyebb az eredő LSF. Az illesztések alapján a feloldás a $196 \pm 20 \text{ nm}$ és $106 \pm 15 \text{ nm}$ -nek adódott, ami $k=0,55$ és $k=0,3$ értékeknek felelnek meg. Az elvi feloldási limit vonal esetén 178 nm .

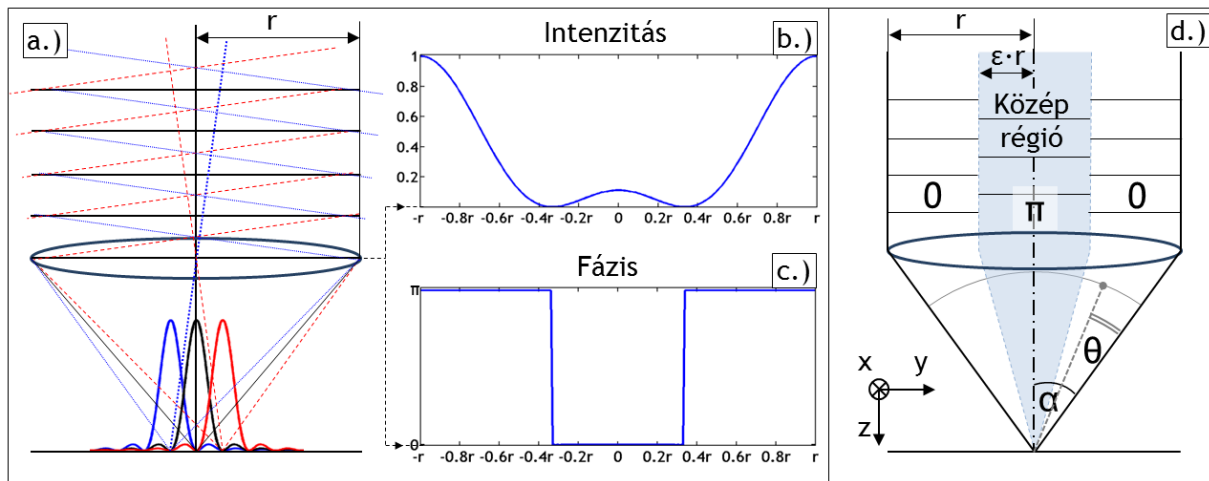


30. ábra: Összehasonlító mérések fázismanipulált és hagyományos kivilágítás mellett. (a) projekciók és azok (b) moduláció függvénye CD nyomólemez esetén. (c) LSF felvétel ezüst nanorészecskékkal.

Az interferométert alkalmazó megoldást annak igazolására használtam fel, hogy a N4 manipulált kivilágítás konfokális detektálással történő kombinálása valóban feloldásjavuláshoz vezet. Probléma azonban, hogy a kettős Michelson interferométer esetén a tükrök dőlésszögében és a fázisban fellépő driftek miatt az LSF_{kiv} eloszlás és ezzel az eredő LSF nem stabil, néhány projekció felvételét követően manuális újraállításra szorul, alkalmazása ezért problémás. Megoldást jelenthet, ha ténylegesen előállítunk egy fázismanipulált rést, vagy a Michelson interferométerek beállítását teljesen automatizáljuk. Az alábbiakban egy ezektől eltérő megoldást ismertetek, amely az apertúra függvény manipulációján alapul.

5.4.2. Fázismanipuláció megvalósítása távoli zónában

Ennél a módszernél a fókuszálásra kerülő nyaláb fázisviszonyait módosítom. Hogy mi lehet a megfelelő fázisprofil, azt az előző fejezetben ismertetett módszer alapján vezethető fel. Tekintsük az előző fejezet szerinti N3 kivilágítást, azaz összegezzünk a fókuszban három darab sinc² eloszlást, amelyekre 0, π , 0 fázistolást gyakoroltunk. Ezt ábrázolja 31.a ábra, ahol x irány azonos a vonal hosszirányával. Ez azt jelenti, hogy a lencse belépő apertúráját három síkhullám



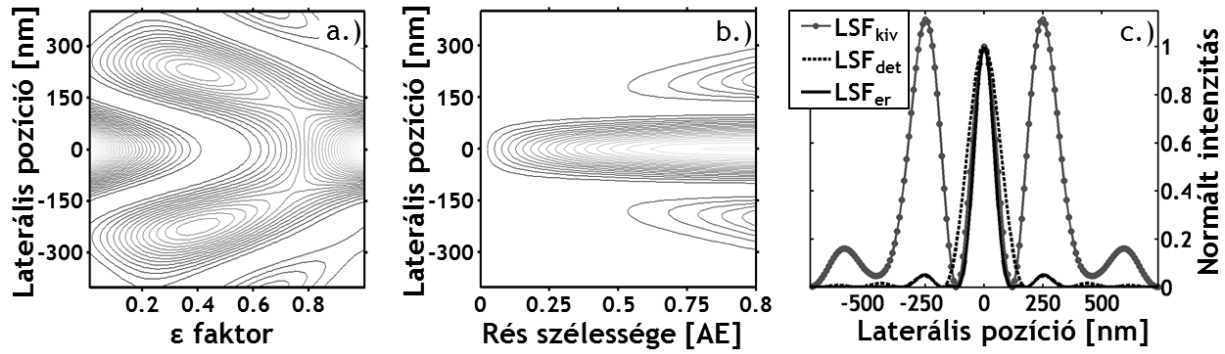
31. ábra: N3 eloszlás (a) előállítása során a belépő apertúra síkjában létrejövő (b) intenzitás és (c) fáziseloszlás. (d) kivilágító nyaláb fázismanipulációja.

éri el. Figyelembe véve ezek egymáshoz viszonyított dőlésszögét és fázisát, ezek fázishelyes összege (interferogramja) kiszámolható a fókuszáló lencse apertúráján. A kapott intenzitáseloszlás, és a fázis látható 31.b és 31.c grafikonokon. Látható, hogy a nyaláb közepén π fázistolás lép fel. Ehhez hasonlóan π fázistolást fogunk alkalmazni a pásztázó vonalat létrehozó hengerhullámra. Középrégió alatt értjük azt a sávot, amely az x irányban az apertúra teljes hosszát kitölti, és y irányban pedig szimmetrikusan kitölti az apertúra középső részét. ε arányszám jellemzi a kitöltés mértékét, azaz megadja, hogy a fázistolást szenvedő középrégió szélessége y irányban mekkora része az apertúra átmérőjének. A megfelelő ε választásával kapott eloszlást konfokális detektálással kombinálva feloldásjavulást érhetünk el. A fázismanipulált nyaláb a konfokális elrendezésnél tárgyalt formalizmussal leírható (2.2), ehhez kivilágítás esetén kell az apertúrafüggvényt módosítanunk az alábbi módon:

$$P_{kiv}(\theta) = \begin{cases} \exp(i\pi) & , \text{ha } \left| \frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right| \leq \varepsilon \\ 1 & , \text{ha } \varepsilon < \left| \frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \right| < 1 \\ 0 & , \text{egyébként} \end{cases} \quad (5.12)$$

Az ily módon keletkező kivilágítás eloszlása (LSF_{ill}), illetve a konfokális detektálás (LSF_{det}) bevezetése révén adódó rendszerátviteli-függvény (LSF_{er}) látható az 32.c ábrán. Megvizsgáltuk, hogy a kivilágító LSF alakja hogyan függ az ε faktor értékétől (32.a).

Ha az ε arányszám 0 és 1, akkor nem történik manipuláció, tehát az 32.a ábra és első oszlopa a manipulálatlan sinc^2 eloszlásnak felel meg. 0,5 értéknél az optikai tengelyen kioltást kapunk és



32. ábra: (a) kivilágítás eloszlásának változása a közép régió szélességének függvényében (b) eredő LSF függése a résszélességtől. (c) kivilágítás, detektálás és eredő LSF $\varepsilon=0.15$ és 0.1AU résszélesség esetén.

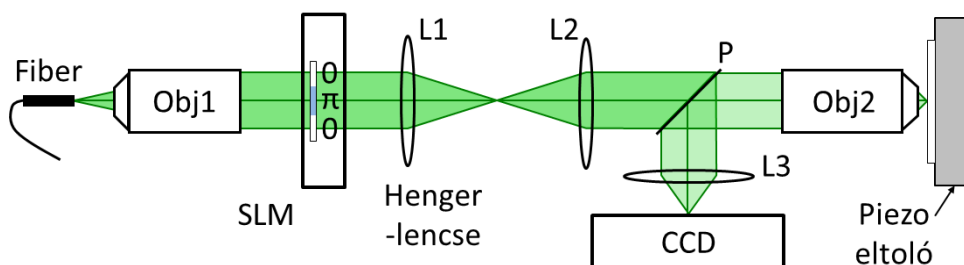
egy, két azonos csúcs alkotta eloszlást. Három csúcsot tartalmazó (N3) eloszlást az $\varepsilon=[0..0.5]$ intervallumban kapunk. ε értékét 0-ról növelve azt tapasztaljuk, hogy a sinc^2 eloszlás első mellékmaximumai növekednek, amelyek $\varepsilon=0.15$ értéknél lesznek közel azonos intenzitásúak a központi csúcs maximumával. Ezt a paramétert fogjuk használni a későbbi számolásoknál és a méréseknél. Megvizsgáltuk továbbá különböző rés szélességek mellett az eredő LSF alakját (32.b). A rés szélességét növelve azt találjuk, hogy a szomszédos csúcsokból származó áthallás (cross-talk) egyre erősebb, azaz az eredő LSF egyre magasabb mellékmaximumokkal rendelkezik, amelyek 0,5 Airy egység széles rés esetén még elhanyagolhatóak. Ekkor 21% fényvesztés lép fel a résen. A módszer kísérleti ellenőrzésekor 0,1 Airy egység széles résszel dolgoztam.

Az alábbi kísérleti elrendezéshez igazodva meghatároztuk a modell segítségével a várható feloldást. A kísérleti adatokhoz igazodva a numerikus apertúra 1,49, az immerziós olaj törésmutatója $n=1.516$, a rés szélessége 0.1AU . A reflexiós üzemmód alkalmazása miatt a

kivilágítás és detektálás hullámhossza egyaránt 532nm. Az LSF-ek félértékszélességét határoztuk meg három esetre: fázismanipuláció nélküli kivilágítás hagyományos detektálással (170nm) és konfokális detektálással (127nm), továbbá fázismanipulált kivilágítás konfokális detektálással (101nm). Ez alapján tehát 40% feloldásjavulás várható. A fluoreszcens méréseknél alkalmazott 0,5AU rés esetén a számolt félértékszélesség fázismanipuláció nélküli kivilágítás és konfokális detektálás esetén 139nm, míg a fázismanipulált kivilágítás és konfokális detektálás esetén 109nm.

Kísérleti elrendezés és ellenőrző mérések.

Egy vonallal pásztázó mikroszkóp segítségével (33.ábra) igazoltam a fázismanipulációs módszer működését. A lézerforrás fényén egy egymódusú optikai szál segítségével végeztem térszűrést. A szálból kilépő fényt Obj1 mikroszkóp objektív (Olympus M4x/NA0,1) kollimálja. Az objektív után egy térbeli fénymodulátor (SLM Holoeye LC2002) hajtja végre egy megfelelő

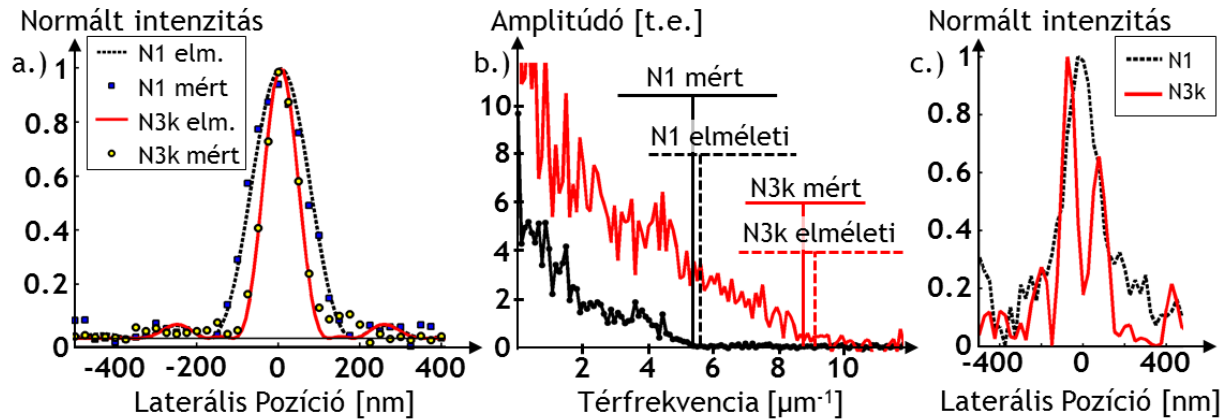


33. ábra: fázismanipulációt konfokálitással kombináló vonalpásztázó mikroszkóp kísérleti elrendezése

szélességű sávban a π fázistolást. Ezután L1 hengerlencse vezeti be az asztigmát. Miután L2 lencse kollimálja a nyalábot M100/NA1,49 Nikon CFI Apochromat TIRF objektív fókuszálja a fényt a mintára. A minta pásztázását egy piezo eltoló végzi. A mintáról reflektált fényt P pellicle (T55/R45) csatolja ki a konfokális kar számára, ahol egy 1 méteres fókusz távolságú lencse (L3) fókuszálja a fényt egy CCD-re, amelynek egy illetve több sora szolgál vonaldetektorként. A CCD egy sora 0,1 Airy egységnek felel meg. Összehasonlításképpen a manipuláció nélküli LSF-eket is rögzítettem. Ehhez a fázistolást megszüntettem az SLM-en. A hagyományos detektálás, azaz a teljesen nyitott rést 3 Airy egységnek megfelelő 30 pixelsor összegzésével valósítottam meg.

Az LSF rögzítéséhez átlagosan 10-50nm átmérőjű ezüst nanorészecskéket tartalmazó mintát alkalmaztam. A vonalpásztással nyert felvételekről különálló részecskéket választottam, és illesztéssel meghatároztam a félértékszélességüket, amelyet 161 ± 10 nm-nek és 95 ± 8 nm-nek találtam hagyományos és fázismanipulált esetben. Ez jó egyezést mutat a számolásban kapott

értékkel. Rögzítettem kiegészítésképpen hagyományos kivilágítás és konfokális detektálás mellett LSF-et, amely esetben a feloldási limit 120 ± 11 nm-nek adódott. Fourier analízissel vizsgáltam több felvételt és határoztam meg a levágási frekvenciát, és az alapján a feloldást. Hagyományos kivilágítást alkalmazva konfokális detektálás nélkül (N1) azt találtam, hogy a feloldás 183 ± 5 nm,



34. ábra: hagyományos (N1) és fázismanipulált (N3k) kivilágítás összehasonlítása ezüst nanorészecskék segítségével, (a) különálló részecskén mért LSF, (b) modulációs átviteli függvény segítségével. (c) közeli részecskék feloldása.

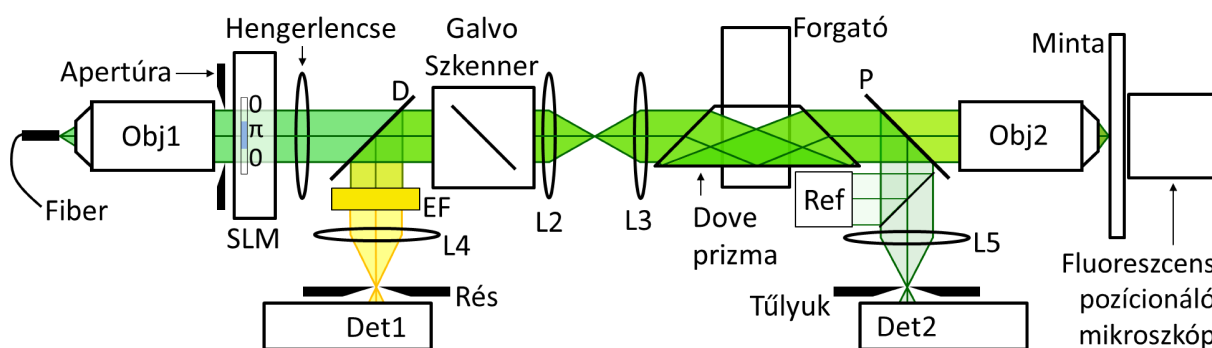
a $178,5$ nm elméleti értékkel szemben. Manipulált kivilágítás és konfokális detektálás esetén (N3k) a feloldás 115 ± 5 nm, ami $k=0,32$ -nek felel meg, míg az elméleti érték $109,9$ nm ($k=0,31$). A javulás mértéke közel 40% a hagyományos LSTOM-hoz ($k=0,5$), és közel 50% egy hagyományos mikroszkóphoz ($k=0,61$) képest.

Diszkusszió, alkalmazhatóság LSTOM rendszerben

A mérések során azt tapasztaltuk, hogy a kivilágítás igen stabil, ahogy az várható is. Néhány dologra azonban tekintettel kell lenni, ha a fenti módszert LSTOM rendszerben alkalmazni akarjuk. Egy lehetséges hibaforrás, ha nem pontosan középen világítjuk ki az apertúrát, ekkor a fókuszban a kivilágító LSF megváltozik és romlik a feloldás. A fent ismertetett modell alapján végzett számolások azt mutatják, hogy ha az apertúra méretéhez képest 3, 4, 5 százalékkal elmozdul a nyáláb, akkor a feloldás rendre 1.1, 2.4, 3.2 százalékkal romlik. Ez az alkalmazott Nikon M100x/1,49NA objektív 6mm-es apertúra mérete mellett azt jelenti, hogy $250 \mu\text{m}$ elmozdulás okoz 2,4% feloldásvesztést. Az 5.1 fejezet alapján tudjuk, hogy ehhez a képforgató prizma és a teleszkóp pontos beállítása szükséges.

5.4.3. Fázismanipulációt megvalósító LSTOM mikroszkóp

Az alábbiakban ismertetem a fázismanipulációt megvalósító, konfokális, fluoreszcens LSTOM mikroszkóp kísérleti elrendezését, és a mérési eredményeket. (Az elrendezést bemutató 35. ábra sematikus, nem méretarányos.) Egy optikai szállal térszűrt nyalábot ($\lambda=532\text{nm}$) kollimál egy Olympus M4x/NA0,1 objektív. A fázistolást a nyaláb középső részén a Holoeye2000 SLM hajtja végre. Az asztigmatizmust egy 200mm fókusz távolságú hengerlencse vezeti be. Egy darab galvo motort helyeztem be, dielektrikum tükörrel szerelve, azaz a rendszer az X hibára korrigálás



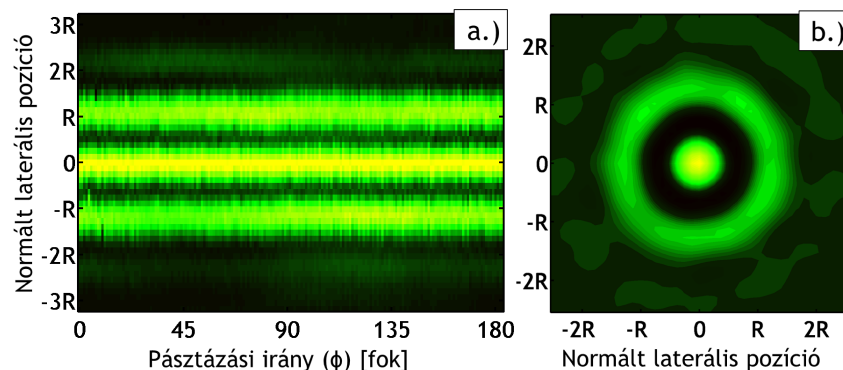
35. ábra: Fázismanipulációt megvalósító LSTOM kísérleti elrendezése

lehetőségét nem tartalmazza. Ezt követ egy teleszkóp, amelyet két, közös fókuszú, 150mm és 200mm fókusz távolságú akromatikus dublet alkot. L3 után helyezkedik el a Dove prizma, majd a pellicle amely a nyaláb $\approx 8\%$ -át kicsatolja az in-situ korrekció és a referencia detektor részére. A mintára a vonalat Nikon M100x/NA1,49 olajimmerziós objektív fókuszálja. Az apertúrákat úgy méreteztem, hogy a vizsgált biológiai minta számára elegendő nagy látómezőt biztosítsak, ami esetünkben $40\mu\text{m}$ vonalhossznak és $\pm 0,8^\circ$ galvo pásztázási tartománynak felel meg. A minta mögött helyezkedik el az 5.3 fejezetben ismertetett pozícionáló mikroszkóp (Zeiss M20x/NA0,4 objektív mögött f100 tubuslencse, annak fókuszában a CMOS kamerával). A minta által emittált fluoreszcens fény visszaközeledik a rendszeren D dikroikus nyalábosztóig, amely kicsatolja a konfokális kar irányába. A konfokális karban helyezkedik el egy emissziós filter (550nm edge) és egy 75mm fókusz távolságú lencse fókuszában egy 10mikronos rés, amelynek szélessége 0,56AU-nak felel meg. Ekkor maximális a résen átjutó fény mennyisége, minimális sidelobe-ok mellett.

A rendszer stabilitásának növelése érdekében a galvo tükröt követő szakaszát optikai ketrecre építettem, és csak a legfontosabb szabadsági fokokat biztosítottam az optikai elemek

számára. A Dove prizma teljesen rögzített, a forgató nem dönthető, az optikai tengely egy tükörpárral hangolható (5.1.3 fejezet, 3. rendszer). Az optikai tengely beállításakor a limacon mérésén és illesztésén alapuló beállítási módszert használtam. Az optikai tengely helyzete olyan, hogy a prizma forgatásakor az objektív belépő apertúráján közelítőleg egy kardoidot ír le (19.b ábra). Ekkor a nyaláb elmozdulása az objektív belépő apertúráján maximálisan $80\mu\text{m}$. A nyaláb elmozdulását tovább minimalizáltam az L2-L3 teleszkóp alapos beállításával, ekkor a pásztázás következtében $84\mu\text{m}$ a nyaláb elmozdulása. A két hiba együttesen legfeljebb $164\mu\text{m}$ elmozdulást okoz, ami alatta marad a korábban kijelölt $250\mu\text{m}$ -es hibahatárnak. A kivilágító LSF több prizmaállás mellett rögzíthető a korrekciós karban elhelyezett túlyukon.

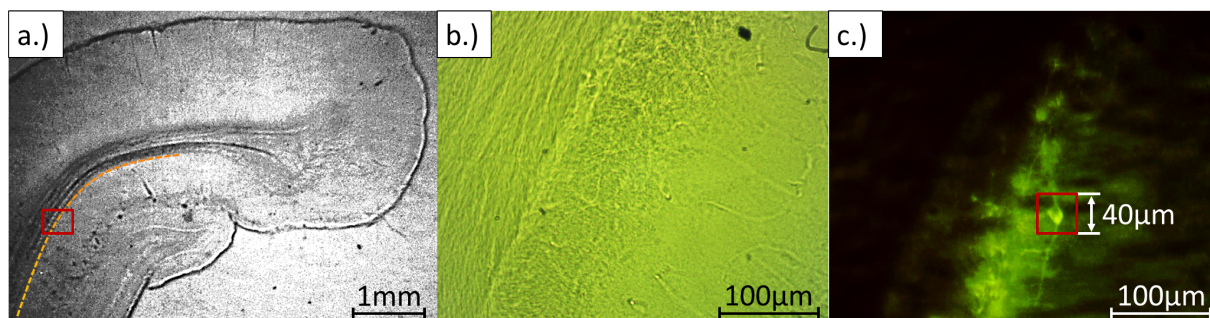
A 36. ábrán látható a túlyuk segítségével rögzített szinogram. Látható, hogy a kivilágítás megfelelően forgatható, leszámítva a $\phi=110^\circ$ körüli régiót, ahol a középső csúcsot övező minimumok nem érik el pontosan a nulla értéket. Ennek az lehet az oka, hogy az objektív nincs pontosan centrálva a kérdéses irányban. A 36.b ábrán látható a kivilágítás rekonstruált, izotróp képe.



36. ábra: (a) az N3 kivilágítás korrekciós karban rögzített eloszlása több pásztázási irány esetén. (b) a kivilágítás rekonstruált képe

Mérések biológiai mintán

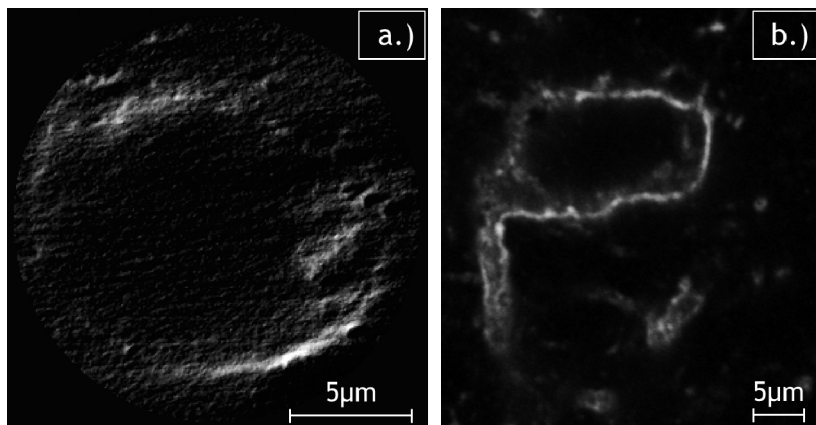
A fent ismertetett elrendezéssel vizsgáltam egy agyi metszetet, amely a patkány agyvelő egy koronális metszete a bregmától számított közelítőleg 5,6 mm távolságban posterior irányban. A szeletről hagyományos reflexiós felvételt láthatunk x.a ábrán. Az érdeklődés tárgyát képező



37. ábra: patkány agyi metszet transzmissziós felvétele (a) 9x-es és (b) 140x-es nagyítás mellett. (c) fluoreszcens pozicionáló mikroszkóppal készült felvétel

sejtek a hippocampusban elhelyezkedő trilamináris sejtek, amelyek közelítőleges pozícióját a narancssárga szaggatott vonal jelöli ki. A téglalappal jelölt tartomány felnagyítva látható x.b ábrán, hagyományos transzmissziós módban. Ugyanazon régióról a pozícionáló mikroszkóppal készített fluoreszcens kép látható x.c ábrán. A minta festése Cy3 festékekkel történt. Látható, hogy a festés nem teljesen szelektív a kérdéses sejtekre nézve. A négyzet jelöli a Nikon M100x/NA1,49 olajimmerziós objektív maximális látómezejét, ami a pásztázó vonal hosszával egyezik meg, azaz $40 \times 40 \mu\text{m}$. Összehasonlítva b és c képeket látható, hogy transzmissziós kép alapján a sejt pontos helyzete nem határozható meg, illetve az is, hogy a $400 \mu\text{m}$ látómezőben csak egy sejt található, azaz a pozícionáló mikroszkóp nélkül, projekciók alapján nem találánk meg a kérdéses sejtet.

A sejtről készített fluoreszcens, manipuláció nélküli kivilágítást alkalmazó konfokális LSTOM felvétel látható 38.a ábrán. Látható, hogy jel/zaj viszony igen kedvezőtlen, aminek több oka lehet. Az egyik ok, hogy a Cy3 festék abszorpciója 532nm gerjesztés mellett 60% körüli. A festék továbbá jelentős fakulást mutatott, ugyanis a pozícionálás, és egy kevésbé részletes szinogram rögzítése során elnyelt gerjesztő fény következtében láthatatlanná



38. ábra: trilamináris sejtről készült felvétel (a) LSTOM (Cy3 festés, $\lambda=532\text{nm}$) és (b) konfokális mikroszkóp (Cy5 festés, $\lambda=633\text{nm}$) esetén

vált a pozícionáláshoz használt CMOS kamera számára. A rendelkezésre álló eszközökkel nem állt módomban a mérést tovább gyorsítani, ezért sem részletesebb, sem több metszetről készült felvételt sem állt módomban rögzíteni. Stabilabb festékekkel és sűrűbb festéssel nem állt módomban megismételni a kísérleteket. Emellett a korábban tárgyaltakhoz igazodva a fényvesztéset a lehető legalaposabban minimalizáltam. Ez az oka, hogy e minta esetén a fázismanipulációt nem állt módomban alkalmazni. Az N3 kivilágítás alkalmazás ugyanis a gerjesztés 25% -os csökkenését vonja maga után. A lézerforrás intenzitásának növelésével nem tudtam ellensúlyozni a gerjesztési fény intenzitásának csökkenést. Az emiatt bekövetkező további jel/zaj viszony romlást az átlagolási pontok számának növelésével részben lehetséges

kompenzálni, de az a mérési idő növekedéséhez, és ezzel a fakulás mértékének fokozódásához vezetett volna.

A rekonstruált képen zajszűrést végeztem, és meghatároztam a sejtek falának vastagságát, amely átlagosan $350 \pm 25 \text{ nm}$ -nek adódott. Az eredményt összevetettem egy Zeiss 710 típusú, hagyományos, ponttal pásztázó konfokális mikroszkóppal készült felvétellel, amely egy Zeiss Plan-Apochromat M100x/1,46NA olajimmerziós objektív, és 633nm gerjesztési hullámhossz alkalmazása mellett készült egy hasonló metszetről, amelyet Cy5 festékkel festettek meg. A 38.b ábra ábrázolja a trilamináris sejtről a Zeiss mikroszkóppal készült képet, amely alapján a sejtfal átlagosan 600nm vastagságúnak adódik. Mivel a két objektív numerikus apertúrája közel azonos, ezért a két eredmény összehasonlítható, ha azokat a hullámhosszakhoz képest tekintjük. LSTOM esetén a falvastagság 65%-a, míg a Zeiss mikroszkóp esetén a 94%-a a gerjesztési hullámhossznak. Ha a kapott falvastagságot az elméleti értékkel akarjuk összevetni, akkor azt kell figyelembe venni, hogy az objektív után a közegek rendre: immerziós olaj, fedőlemez, glicerín, agyi szövet. Mivel a mintában a sejt a szövet egy mélyebb régiójában helyezkedett el, ezért az emittált fény nem közvetlenül a szövet feletti glicerínrétegbe lép be. Ezért az immerziós olajra ($n=1,516$) megadott numerikus apertúrát korrigálni kell egy feltehetőleg vízhez közeli ($n=1,31$) törésmutatóval rendelkező közegre. Ekkor a numerikus apertúrát 1,28-nak tekintve az elméletileg várt feloldások a gerjesztési hullámhosszakra számolva: 208nm ($k=0,5$; $\lambda=566\text{nm}$), 302nm ($k=0,61$, $\lambda=633\text{nm}$). Látható, hogy LSTOM esetén lényegesen közelebb esik a mért falvastagság a feloldási határhoz. A mintán találhatóak voltak különálló, pontszerű források, amely segítségével rögzítettem az LSF-et. A mérés zaja és a fakulás miatt rövidre szorított mérések miatt igen nagy szórással a laterális feloldás $200 \pm 35 \text{ nm}$ -nek adódott, aminek tükrében a fenti törésmutató becslés realitásnak tűnik. Ez alapján elmondható, hogy a sejtfalak vastagsága valóban nagyobb az LSTOM feloldási határánál, és mivel méretüket nem az LSTOM feloldása limitálja, vastagságuk 350nm-nek tekinthető. Ez azt is jelenti, hogy a fázismanipuláció alkalmazhatóságának ellenőrzésére kisebb részletekkel rendelkező minta szükséges. Továbbá stabilabb festék, és a mérés további gyorsítása javasolt.

Diskusszió

Megvizsgáltam fázismanipuláció alkalmazhatóságát vonal-kivilágításra. Elsőként egy interferenciás módszert mutattam be, amellyel 34%-os laterális feloldásjavulást értem el hagyományos vonal-kivilágításhoz képest. A módszerhez kapcsolódó stabilitási gondokat részben sikerült megoldanom, de ez a hosszú távú mérésekhez nem elegendő. Ezért egy stabilabb megoldást valósítottam meg, melynek során az objektívet kivilágító nyaláb fázisviszonyait befolyásoltam egy SLM segítségével. Kísérletileg igazoltam a laterális feloldás 38%-os javulását. A manipulációs módszer LSTOM rendszerben történő alkalmazhatóságát vizsgáltam, és a kritériumokhoz igazodva finomítottam az optikai elemek beállítási pontosságát. Igazoltam, hogy a manipulált kivilágítás megfelelően forgatható, de valós biológiai minta esetén csak a hagyományos kivilágítást tudtam alkalmazni. Ennek kísérleti oka, a kioltás miatti fényvesztés, és az adatgyűjtés időigényes mivolta. Ezek a problémák részben orvosolhatóak, ha a megfelelő eszközök lecserélésre kerülnek. Megfontolandó ezen felül, hogy vonalpásztázó mikroszkópban alkalmazzuk a manipulációt, és SIM kivilágítással kombináljuk. Ekkor, ha a kombináció révén keletkező PSF izotrópiája kielégítő, akkor a forgatás elhagyása révén lényegesen egyszerűbb rendszert kapnánk. Az ilyen irányú alkalmazhatóság további vizsgálatokat igényel.

6. Konklúzió

1. *Vonallal pásztázó tomográfiás optikai mikroszkópban (LSTOM) alkalmazott képforgató prizma hibás beállításának és forgatásának a képalkotásra gyakorolt hatását vizsgáltam optikai nyalábkövetés és numerikus szimulációk alkalmazásával. Kritériumot határoztam meg, mely szerint, ha a pásztázó vonal elmozdulása nem haladja meg a laterális feloldás $1/10$ -ét, akkor a rekonstruált kép laterális feloldásának romlása nem haladja meg a 2%-ot.*

LSTOM mikroszkópban kritikus pont a pásztázó vonal és a pásztázási irány forgatása ugyanis, ha a tomográfiás adatgyűjtés során a projekciókat nem egy pont körül rögzítjük, akkor a rekonstruált kép minőségromlást szenved. Ilyen hibát eredményez, ha az LSTOM rendszerben használt képforgató prizma a beállítás pontatlansága vagy a forgató hibája miatt eltéríti az optikai tengelyt. Az ezzel kapcsolatos hibákat vizsgáltam optikai nyalábkövetéssel, és szimulációkkal. Azt találtam, hogy ha a pásztázó vonal elmozdulása nem haladja meg a laterális feloldás (R) $1/10$ -ét, akkor a rekonstruált kép laterális feloldásának romlása nem haladja meg a 2%-ot. Ezen kritérium megvalósíthatóságát vizsgáltam elméletileg és kísérletileg több LSTOM elrendezés esetén. [T1]

2. *Kettőstörő lemez segítségével létrehozott asztigmias vonalat alkalmaztam LSTOM mikroszkópban, ezáltal stabilabb forgatást valósítva meg, mint képforgató prizmával.*

Asztigmia vezethető be egy p-típusú kalcit lemezen átfókuszálva egy lineárisan polarizált nyalábot. A fókuszban létrejövő vonal forgatható a lemez és a polarizációs irány együttes forgatásával. A módszer előnye, hogy a pásztázó vonal laterális pozíciója független a kettőstörő lemez eltolásától, és a lemez dőlésszögét is elegendő nagyságrendileg 0.01° pontosan beállítani, ezáltal kevésbé érzékeny a beállításra és a forgatásra, mint a képforgató prizma. Kísérletileg megvalósítottam az asztigmias kivilágítást LSTOM mikroszkópban. A rögzített kép izotróp és rekonstrukciós hibáktól mentes, ami az jelenti, hogy a vonal hibamentesen forgatható. Emellett 10% feloldásjavulást tapasztaltunk a hagyományos mikroszkóp elvi feloldásához képest. [T2]

3. *Fluoreszcens biológiai minták vizsgálatára alkalmas konfokális LSTOM mikroszkópot építettem. A rögzített képek rekonstrukciós hibáktól mentesek és a laterális feloldás 17%-kal haladja meg a hagyományos mikroszkóp feloldását.*

Fluoreszcens mérésekre alkalmas LSTOM rendszert építettem és tesztminták segítségével vizsgáltam a mikroszkóp képalkotását. Convallaria Majalis mintáról rögzített képek rekonstrukciós hibáktól és aberrációktól mentesek, továbbá demonstrálják a mikroszkóp optikai szeletelési tulajdonságát. Festett 200nm polisztírol gömbről készült felvétel alapján elmondható, hogy a rendszer pontátviteli függvénye izotróp, és az ez alapján számolt, Rayleigh értemben vett laterális feloldás ($0.67\mu\text{m}$ [$\lambda_{\text{ger}}=532\text{nm}$, $\text{NA}=0.4$]) jó egyezésben van az elméleti értékkel ($0.665\mu\text{m}$). Ez alapján a laterális feloldás 17%-kal haladja meg a hagyományos mikroszkóp feloldását. [T1]

4. *Vonallal pásztázó mikroszkópban 37%-os laterális feloldásjavulást valósítottam meg a kivilágítás fázismanipulációja és konfokális detektálás alkalmazása révén.*

A kivilágító nyaláb fázisviszonyainak megváltoztatásával finomabb vonalszerű struktúrát hoztam létre egy vonallal pásztázó mikroszkóp fókuszában. Ehhez a nyaláb közepén π fázistolást vezettem be. A speciális kivilágítást konfokális detektálással kombináltam, ezzel eliminálva a kivilágítás mellékcúsaiból származó fényt. Elméletileg vizsgáltam a fázistolás kitöltési tényezőjének, és a konfokális rés szélességének hatását a rendszer eredő vonalátviteli függvényére. A kitöltési tényező optimális értéke ≈ 0.15 , és a rés szélessége nem haladhatja meg a 0.5 Airy egységet. Méréseket végeztem ezüst nanorészecskékből álló mintán, és azt találtam, hogy 532nm hullámhosszúságú kivilágítás és 1.49 numerikus apertúrájú objektív alkalmazása mellett a laterális feloldás (a Rayleigh kritérium alapján) 115nm. Ugyanezen rendszerben a manipuláció és konfokális detektálás nélkül 183nm mérhető, amelyhez viszonyítva a feloldásjavulás 37%. A javulás mértéke 36% a hagyományos vonalpásztázó mikroszkóp (179nm) és 47% hagyományos mikroszkóp (218nm) esetén, az azonos hullámhossz és numerikus apertúra mellett számolt, elvi értékekhez viszonyítva. A módszer elméletileg alkalmazható LSTOM rendszer feloldásának növeléséhez. [T3]

7. Summary

1. *I investigated the effect of center of rotation error caused by image rotating prism and rotator in line-scanning tomographic optical microscope (LSTOM) using numerical simulations and ray-tracing. I demonstrated that the lateral resolution degradation of the reconstructed image will be less than 2% when the amplitude of the COR error remains under 1/10 of the system's nominal lateral resolution.*

A LSTOM microscope system requires precise rotation of the scanning line. In LSTOM, the COR error is caused by the misalignment of the Pechan prism or the imperfection of the rotation stage. Both sources of the COR error deflects the optical axis and makes the projections shifted relative to each other, that causes errors of the reconstructed image. I have studied the effects of the error using numerical simulations. The errors, introduced by the misalignment of the prism, were investigated using OSLO ray-tracer software, and estimations were made for the alignment parameters. My calculations showed that the lateral resolution degradation is expected to be less than 2%, if the amplitude of the COR error is less than 1/10 of the system's nominal lateral resolution. Alignment errors were investigated experimentally and theoretically in three different LSTOM setup. [T1]

2. *I used an astigmatic line, produced by means of a birefringent plate, as a line illumination in LSTOM microscope. The method provides enhanced rotation stability compared to the precision of a rotation prism.*

Astigmatic line was generated by focusing a linearly polarized laser beam through a p-type calcite plate. If the polarization of the incident beam and the calcite plate are synchronously rotated, the line will be rotated with the same angle. The rotation has large stability because both rotated optical elements are translation invariant and their slight lateral drift does not affect the axis of rotation. The alignment precision regarding the tilt of the plate is about 0.01° . I built a LSTOM system using astigmatic illumination and I investigated the imaging quality of the microscope. I found the captured images to be isotropic and free from reconstruction errors. This demonstrates that the rotation of the line was performed error-free. The lateral resolution was found 10% better compared to the resolution of a widefield microscope. [T2]

3. *I constructed a confocal LSTOM microscope with fluorescent imaging capability. The captured images are error-free with a resolution improvement of 17% compared to a traditional widefield microscope.*

I checked the imaging performance of the LSTOM system in confocal, fluorescent mode, using fluorescent test samples. The images captured from *Convallaria Majalis* test samples are free from reconstruction errors and aberrations, and they are demonstrating the optical sectioning capability of the system. The reconstructed image of 200nm fluorescent bead is showing that the point spread function of the system is isotropic; therefore the reconstruction is error-free. I found that the lateral resolution is $0.67\mu\text{m}$ ($\lambda_{\text{exc}}=532\text{nm}$, $\text{NA}=0.4$), which is in a good agreement with the theoretical value ($0.665\mu\text{m}$). Consequently, the resolution of LSTOM exceeds the resolution of a widefield microscope by 17%. [T1]

4. *I improved the lateral resolution of a line scanning microscope by 37%, applying phase apodization on the illumination combined by confocal detection.*

By modifying the phase structure of the incoming beam, I created an illumination LSF consisting of triple peaks in the focal plane. The central peak was narrower than the normal LSF, and only an area, illuminated by the central peak, was detected by means of confocality. I studied the effect of the obstruction ratio (ϵ) and the confocal slit width on the resulting LSF theoretically, using scalar diffraction theory. An optimum can be found at around $\epsilon=0.15$ and the slit width should be kept below 0.5 Airy Units. The optical transfer functions were determined by means of Fourier analysis of captured images of silver nanoparticles ($\lambda=532\text{nm}$, 1.49 NA, Oil). The Rayleigh resolution limits were calculated from the determined cut-off frequencies. The values in the normal and modified illumination cases were $183\pm 5\text{nm}$ and $115\pm 5\text{nm}$, respectively. That means an improvement of 37% in lateral resolution. Resolution enhancement is 36% and 48% compared to the theoretical resolution of line scanning (179nm) and widefield (218nm) microscopes. This method can be used in LSTOM microscope to achieve further resolution enhancement. [T3]

Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönöm témavezetőimnek, Dr. Szabó Gábornak és Dr. Erdélyi Miklósnak szakmai tanácsait és, hogy kutatásaimhoz szükséges erőforrásokat, eszközöket rendelkezésemre bocsátották. Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni, hogy lehetővé tették a szakmai fejlődésemet elősegítő, és perspektívámat szélesítő nemzetközi konferenciákon való részvételeket. Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékének a kutatásaimhoz szükséges erőforrások megteremtését.

Köszönöm legközvetlenebb munkatársaimnak Gajdátsy Gábornak, és Sinkó Józsefnek a kreatív konzultációkat, a közös progresszív és eredményes laboratóriumi és elméleti munkát. Különösen hálás vagyok a publikációk elkészítésében és lektorálásában nyújtott segítségükért. Köszönöm emellett mindenkori labortársamnak, Tátrai Dávidnak, hogy rugalmas és segítőkész volt a laboratóriumi feladatok összehangolásában. Mindhármuknak köszönöm, hogy mindig prezentálhattam nekik ötleteimet, terveimet, és, hogy szakmailag bírálták, kiegészítették azokat. Örülök, hogy hozzájárultak a kellemes munkaköri légkör megteremtéséhez.

Köszönöm Dr. Tóth Zsoltnek, Dr. Gingl Zoltánnak és Dr. Kokavec Jánosnak a szakmai konzultációkat és a kísérleti munkámhoz nyújtott segítségüket.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, az SZTE Növénybiológiai Tanszék és az Oxfordi Egyetem munkatársainak, különösen: Dr. Steinbach Gábornak, Dr. Ferhan Ayaydinnak, Dr. Valkai Sándornak, Dr. Kolbert Zsuzsannának, Dr. Kónya Zoltánnak, Dr. Somogyi Józsefnek és Szemenyei Viktornak a segítségét, közreműködését. Köszönöm, hogy segítségemre voltak a mikroszkópiás mérésekben és a kapcsolatos mintapreparálások kivitelezésében.

Köszönöm a Fotoakusztikus és a TeWaTi kutatócsoport munkatársainak, hogy a „nincs véletlenül egy” típusú pillanatokban segítségemre voltak.

Köszönöm a tanszéki iroda és műhely dolgozóinak a munkáját, segítségét, mindenkori türelmüket és segítőkészségüket.

Hálás vagyok minden barátomnak, különösen Násztor Zoltánnak és Kiss Gábornak, hogy a nehéz időszakokban támogattak és a siker perceiben együtt örültek velem.

Köszönöm a feleségem és családom türelmét, támogatását, biztatását!

Irodalomjegyzék

Tézispontokhoz kapcsolódó cikkek

- [T1] L. Dudás, G. Gajdáty, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Szabó: "Correction of error motion in a line-scanning tomographic optical microscope" Appl. Opt. 51, 6319 (2012)
- [T2] J. Sinkó, L. Dudás, G. Gajdáty, M. Erdélyi, G. Szabó, "Map-free line-scanning tomographic optical microscope", Opt. Let. 36, 4011-4013 (2011)
- [T3] L. Dudás, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Szabó: "Confocal line-scanning microscope with modified illumination" Opt. Let. 37, 4293 (2012)

További cikkek és szabadalom

- [E1] G. Gajdáty, L. Dudás, M. Erdélyi, G. Szabó, "Line-scanning tomographic optical microscope with isotropic transfer function", Journal of Optics 12(11) 115505 (2010)
- [E2] G. Szabó, M. Erdélyi, G. Gajdáty, L. Dudás, "Optical microscope system and method carried out therewith for reconstructing an image of an object", Patent Application WO/2009/030966 (2009)
- [E3] M. Erdelyi, E. Rees, D. Metcalf, G. S. Kaminski Schierle, L. Dudas, J. Sinko, A. E. Knight, and C. F. Kaminski: „Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy" Opt. Exp., Vol. 21, Issue 9, pp. 10978-10988 (2013)

Konferencia

- [E4] L. Dudás, "Line-scanning tomographic optical microscope", előadás, 11th international ELMI meeting, Alexandroupolis, Görögország (2011)
- [E5] L. Dudás, M. Erdélyi, J. Sinkó, G. Gajdáty, G. Szabó: "Line-scanning tomographic optical microscope" poszter prezentáció, Focus on Microscopy (FOM) konferencia, Szingapúr (2012)
- [E6] L. Dudás, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Gajdáty, G. Szabó: "Line-scanning tomographic optical microscope" poszter prezentáció, 12th International ELMI meeting on Advanced Light Microscopy Leuven, Belgium (2012)

További hivatkozások

- [1] Nölting, Bengt, "Methods in Modern Biophysics", 3rd ed. (Springer Verlag, 2010)
- [2] Novotny L. and Hect B., "Principles of Nano-optics", Chapter 5-6, (Cambridge University Press, 2006)
- [3] Guy Cox, "Optical Imaging Techniques in Cell Biology", 1.ed, (CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006)
- [4] Michael Bass (Ed. in Chief), "Handbook of Optics", 3rd, Vol I., Chapter 28,30, (Mc Graw Hill, 2010)

- [5] F. Zernike, “*How I discovered phase contrast*,” Science 121(3141), 345–349 (1955).
- [6] Diaspro, Alberto (Ed.), “*Optical Fluorescence Microscopy, From the Spectral to the Nano Dimension*” (Springer Verlag 2011)
- [7] Minsky M., “*Microscopy apparatus*“, US Patent 3013467, (1961)
- [8] Sheppard C.J.R. and Choudhury A., “*Image formation in the scanning microscope*“, Optica 24: 1051., (1977)
- [9] Pawley J.B., “*Handbook of Biological Confocal Microscopy*“, 3rd, (Springer 2006)
- [10] Fiolka R, Stemmer A, Belyaev Y, “*Virtual slit scanning microscopy*”, Histochem. Cell. Biol. 128:499–505 (2007)
- [11] Kang-Bin Im, Sumin Han, Hwajoon Park, Dongsun Kim, and Beop-Min Kim, “*Simple high-speed confocal line-scanning microscope*“, Opt. Express 13, 5151-5156 (2005)
- [12] Alberto Diaspro “*Confocal and Two-Photon Microscopy: foundations, references and advances*“, Chapter 3, (Wiley-Liss Inc., 2002)
- [13] M. Lang, T. Muller, J. Engelhardt, et al. “*4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging*“ Optics Express 15 2459-2467 (2007)
- [14] E. H. K Stelzer, S. Lindek “*Fundamental reduction of the observation volume in far-field light-microscopy by detection orthogonal to the illumination axis - confocal theta microscopy*“, Optics Communications 111 536-547 (1994)
- [15] S. Lindek, E. H. K. Stelzer, *Resolution improvement by nonconfocal theta microscopy*, Optics Letters 24 1505-1507 (1999)
- [16] Born M. and Wolf E., “*Principles of Optics*“ 7th, Chapter 8, (Cambridge University Press 2006)
- [17] M. Martinez-Corral, P. Andres, C. J. Zapata-Rodriguez, and M. Kowalczyk, “*Three-dimensional superresolution by annular binary filters*,” Opt. Commun. 165, 267–278 (1999).
- [18] Min Gu, C.J.R. Sheppard , “*Three-dimensional Imaging in Confocal Fluorescent Microscopy with Annular Lenses*“, Journal of Modern Optics, Vol. 38, Iss. 11, (1991)
- [19] B. J. Thompson, “*Diffraction by semitransparent and phase annuli*,” J. Opt. Soc. Am. 55(2), 145–149 (1965)
- [20] John W. Y. Lit, “*Effects of a Half-Wave Filter in a Portion of the Aperture of a Perfect Lens*“, J. Opt. Soc. Am. 61, 297-302 (1971)

- [21] Harold Osterberg and J. Ernest Wilkins, Jr., “*The Resolving Power of a Coated Objective*,” J. Opt. Soc. Am. 39, 553-557 (1949)
- [22] L. R. Qiu, X. Ding, and J. Liu, “*Confocal measurement approach for enhancing lateral resolution using a phase-only pupil*,” J. Phys. Conf. Ser. 13, 422–425 (2005).
- [23] M. A. A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, Z. J. Laczik and V. Sarafis, “*Optimized pupil-plane filters for confocal microscope point-spread function engineering*,” Opt. Lett. 25, 245-247 (2000)
- [24] Dorn R., Quabis S. and Leuchs G., “*Sharper Focus for a Radially Polarized Light Beam*“, Phys. Rev. Lett. 91 (2003)
- [25] Colin J. R. Sheppard and Amarjyoti Choudhury, “*Annular Pupils, Radial Polarization, and Superresolution*“, Applied Optics, Vol. 43, Issue 22, pp. 4322-4327 (2004)
- [26] B. R. Boruah, “*Lateral resolution enhancement in confocal microscopy by vectorial aperture engineering*,” Appl. Opt. 49, 701-707 (2010)
- [27] Huisken, J. & Stainier, D.Y.R. “*Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology*“, Development 136, 1963–1975 (2009).
- [28] T. A Planchon, L. Gao, D. E. Milkie, M. W. Davidson, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, E. Betzig, “*Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination*,” Nature Methods 8, 417–423 (2011)
- [29] Makio Tokunaga, Naoko Imamoto, Kumiko Sakata-Sogawa, “*Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells*“, Nature Methods - 5, 159 - 161 (2008)
- [30] M. G. L. Gustafsson “*Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution in Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*“ 13081-13086 (2005)
- [31] L. Schermelleh, P. M. Carlton, S. Haase, et al. “*Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy*“, Science 320 1332-1336 (2008)
- [32] Gustafsson, M.G. “*Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*.” J Micr 198:82-87 (2000)
- [33] Lothar Schermelleh, Rainer Heintzmann, Heinrich Leonhardt, “*A guide to super-resolution fluorescence microscopy*“, J Cell Biol. 190(2):165-75. (2010)

- [34] Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F., “*Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*“, Science 15 pp.:5793 (2006)
- [35] Rust J. M., Bates M and Zhuang X, “*Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*“, Nature Methods 3 pp.: 793 - 796 (2006).
- [36] Stefan W. Hell and Jan Wichmann, “*Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*“, Opt. Lett. 19, 780-782 (1994)
- [37] Peter J. Dwyer, Charles A. DiMarzio, and Milind Rajadhyaksha, “*Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues*“ Applied Optics, Vol. 46, Issue 10, pp. 1843-1851 (2007)
- [38] Ondrej Mandula, Martin Kielhorn, Kai Wicker, Gerhard Krampert, Ingo Kleppe, and Rainer Heintzmann, “*Line scan - structured illumination microscopy super-resolution imaging in thick fluorescent samples*“, Opt. Express 20, 24167-24174 (2012)
- [39] Taejoong Kim, DaeGab Gweon and Jun-Hee Lee, “*Enhancement of fluorescence confocal scanning microscopy lateral resolution by use of structured illumination*“, Meas. Sci. Technol. 20 055501 doi:10.1088/0957-0233/20/5/055501 (2009)
- [40] MyoungKi Ahn, Taejoong Kim, YoungDuk Kim, DaeGab Gweon and Jun-Hee Lee, “*Cross structured illumination for high speed high resolution line scanning confocal microscopy*“, Meas. Sci. Technol. 22 015503, (2011)
- [41] Edward J. Botcherby, Martin J. Booth, Rimas Juškaitis, and Tony Wilson, “*Real-time slit scanning microscopy in the meridional plane*“, Opt. Lett. 34, 1504-1506 (2009)
- [42] Martinez-Corral M *Point spread function engineering in confocal scanning microscopy*. Proceedings of SPIE Vol. 5182 112 (2003)
- [43] S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-Oka and M. Terazima “*A line-scanning semi-confocal multi-photon fluorescence microscope with a simultaneous broadband spectral acquisition and its application to the study of the thylakoid membrane of a cyanobacterium Anabaena*“ PCC7120 Journal of Microscopy 228 240–254 (2007)
- [44] Guenther R. D., “*Modern Optics*“, Chapter 10, (John Wiley & Sons 1990).

- [45] Thomas Jue (Ed.), “*Fundamental Concepts in Biophysics*“, Vol.1, Chapter 6. (Humana Press, Springer 2009)
- [46] Min Gu, “*Advanced Optical Imaging Theory*“ (Springer 2000)
- [47] Sheppard CJR, Mao XQ, “*Confocal Microscopes with Slit Apertures*“ J Mod Opt 35(7):1169–1185 (1988)
- [48] Dusch E, Dorval T, Vincent N, Wachsmuth M, and Genovesio A. “*Three-dimensional point spread function model for line-scanning confocal microscope with high-aperture objective*“ J. Microsc. 228: 132-138. (2007)
- [49] C. Kak. and M. Slaney, “*Principles of Computerized Tomographic Imaging*“, Chapter 4., 5. (IEEE Press, 1988).
- [50] K. Iizuka, “*Engineering Optics*“, 3rd, Chapter 11.,14. (Springer-Verlag, 2008).
- [51] R. A., Di Chiro G., “*Principles of Computer Assisted Tomography (CAT) in Radiographic and Radioisotopic Imaging*“, Phys. Med. Biol., 21(5) pp.: 689-732 (1976).
- [52] Hsieh, Jiang, “*Computed tomography : principles, design, artifacts, and recent advances*“, 2nd ed., Chapter 3. (SPIE; Wiley Interscience, 2009)
- [53] Barnes, F.L. ; Azevedo, S.G. ; Martz, H.E. Jr. ; Roberson, G.P. ; Schneberk, D.J. ; Skeate, M.F., “*Geometric effects in tomographic reconstruction*“, (1990)
- [54] G T Gullberg, B M W Tsui, C R Crawford and E R Edgerton, “*Estimation of geometrical parameters for fan beam tomography*“, Phys. Med. Biol. 32 1581, (1987)
- [55] Marek Karolczak, Klaus Engelke, Andreas Lutz, Ulrike Taubenreuther, and Willi Kalender, “*Implementation of a cone-beam reconstruction algorithm for the single-circle source orbit with embedded misalignment correction using homogeneous coordinates*“, Med. Phys. 28, 2050 (2001)
- [56] Yi Sun; Ying Hou; Jiasheng Hu;, “*Reduction of Artifacts Induced by Misaligned Geometry in Cone-Beam CT*“, Biomedical Engineering, IEEE, Vol. 54, 8; (2007)
- [57] C. Mennessier, R. Clackdoyle, F. Noo , “*Direct determination of geometric alignment parameters for cone-beam scanners*“, Phys. Med. Biol. 54 1633, (2009)
- [58] Tilman Donath, Felix Beckmann, and Andreas Schreyer, “*Automated determination of the center of rotation in tomography data*“, JOSA A, Vol. 23, Issue 5, pp. 1048-1057 (2006)

- [59] Alexander Sasov, Xuan Liu and Phil L. Salmon, “*Compensation of mechanical inaccuracies in micro-CT and nano-CT*“, Proc. SPIE 7078, 70781C (2008)
- [60] J. Sharpe: “*Optical Projection Tomography*“, US Patent App. 10/522,932, (2003).
- [61] J. Sharpe, U. Ahlgren, P. Perry, B. Hill, A. Ross, J. Hecksher-Sørensen, R. Baldock, D. Davidson “*Optical Projection Tomography as a Tool for 3D Microscopy and Gene Expression Studies Science*“ 296 541 – 545 (2002)
- [62] Rieckher M, Birk UJ, Meyer H, Ripoll J, Tavernarakis N, “*Microscopic Optical Projection Tomography In Vivo*“, PLoS ONE 6(4): e18963 (2011).
- [63] A. M. Zysk, F. T. Nguyen, A. L. Oldenburg, et al., “*Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside*“, Journal of Biomedical Optics 12 (5): 051403, (2007)
- [64] R. A. Leitgeb, W Drexler, A Unterhuber, et al., “*Ultrahigh resolution Fourier domain optical coherence tomography*“, Optics Express 12 2156-2165, (2004)
- [65] Demirhan Kobat ; Nicholas G. Horton ; Chris Xu, “*In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex*“, J Biomed Opt. 16(10):106014. doi: 10.1117/1.3646209. (2011)
- [66] V. Lauer, “*New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope*“, Journal of Microscopy 205 165-176, (2002)
- [67] M. Debailleul, V. Georges, et al., “*High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples*“, Optics Letters 34(1) 79-81, (2009)
- [68] Reto Fiolka, Kai Wicker, Rainer Heintzmann, and Andreas Stemmer “*Simplified approach to diffraction tomography in optical microscopy*” Optics Express 17(15) 12407-12417 (2009)
- [69] Gajdáty Gábor, “*Vonalpásztázáson alapuló tomográfias optikai mikroszkóp elméleti és kísérleti vizsgálata* “ (Doktori értekezés, Szegedi Tudományegyetem, 2010)
- [70] Hecht E., “*Optics*“ 4th, Chapter 8 (pp.: 69), (Addison Wesley, 2002).
- [71] Saleh B. E. A., Teich M. C., “*Fundamentals of Photonics*“ 2nd, (Wiley 2007).
- [72] Born M. and Wolf E., “*Principles of Optics*“ 7th, Chapter 15, (Cambridge University Press, 2006)

- [73] Erdélyi M., Bereznai M., Gajdáty G., Bor Zs., “*Three-dimensional focus manipulation by means of a birefringent plate*“, Optics Communications 281 pp.: 4807-4811 (2008).
- [74] A. Macgregor, “*Beam profiling: know your beam*“, Laser Focus World 42, 115-118 (2006).
- [75] Richardson, Timothy M, “*Test slide for microscopes and method for the production of such a slide*“, Bio-Microtech, US 2004/0227937 A1(2004)
- [76] Chaffer J, Bauch H., “*Test preparation for microscopes*“, US Patent, US20040180384 (2004)
- [77] Donald L. Sullivan, “*Alignment of Rotational Prisms*“, Appl. O., Vol. 11, Issue 9, pp. 2028-2028 (1972)
- [78] Kim, Dongik Shin, Deokwon Yun, and Changsoo Han, “*The Analysis of Radial/Axial Error Motion on a Precision Rotation Stage*“, International Journal of Electrical, Computer, and Systems Engineering, 1(4), pp.248-252, (2007)
- [79] J. Dennis Lawrence, “*A catalog of special plane curves*“, Dover Publications. pp. 113-118. (1972)
- [80] Warren J. Smith, “*Modern Optical Engineering*“, 3rd, Chapter 4 (McGraw-Hill 2000)